



Master Biologie, Géosciences, Agronomie, Environnement
Spécialité : Biologie Fonctionnelle des Plantes

Parcours : M2 professionnel
Génomique et Technologies Avancées des Plantes

Année universitaire 2006-2007

Contribution à l'identification et au clonage du
gène de résistance *Pi33* du riz à *Magnaporthe*
oryzae

Stage effectué par ZINI Cyrille



Au sein de l'UMR BGPI du Centre de Coopération Internationale

En Recherche Agronomique
Pour le Développement



Responsable de stage : Didier THARREAU
Co-responsable de stage : Elsa BALLINI



Soutenu le 11 septembre 2007

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le directeur de l'UMR, Jean-Loup NOTTEGHEM qui m'a accueilli au sein de l'UMR BGPI et toute l'équipe 4.

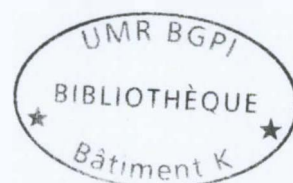
Je tiens à remercier tout particulièrement mon maître de stage, Didier THARREAU. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour les conseils qu'il m'a apportés au cours de mes travaux et de la rédaction du mémoire, pour son très grand professionnalisme. Encore merci pour cette expérience unique. Bien sur, je n'oublie pas Elsa BALLINI qui m'a co-encadré sur ce stage. Je tiens à la remercier de m'avoir initié à la joie du clonage, de ses conseils avisés tout au long du stage, et d'avoir pris du temps à encadrer un stagiaire surtout en fin de thèse.

Je remercie aussi Jean-Benoît MOREL pour ses conseils et ses nouvelles pistes à chaque fois que c'était nécessaire pour avancer. Je remercie aussi Henri, Loic (bon rétablissement) et Christophe pour s'être si bien occupés des plants de riz. Je n'oublie pas non plus Corinne, Véronique C, Joëlle, Judith, Emilie, Virginie, Véronique L, Nabila pour leur aide quand j'en avais besoin.

Je remercie aussi l'équipe 2 de m'avoir proposé de jouer au volley-ball et ainsi de me vider la tête en tapant sur un ballon (surtout lors de la rédaction du mémoire).

Je remercie aussi l'ensemble du personnel de l'UMR BGPI et de tous les gens que j'ai pu croiser lors de mon stage.

Je ne puis finir ces remerciements sans mentionner ma famille, qui m'a soutenu au cours de mes études, et d'une personne très chère à mon cœur que je ne citerai pas mais avec qui j'espère faire un bon bout de chemin avec.



Sommaire

I) Présentation de l'entreprise	p.I
II) Enjeux socio-économiques	p.II
III) Situation du projet dans la thématique de l'équipe	p.II

1) Contexte général	p.1
1-1) Les interactions plantes / microorganismes phytopathogènes	p.1
1-1-1) Types d'interactions et modèles	p.1
1-1-2) Les types de gènes de résistance	p.2
1-2) Riz / <i>Magnaporthe oryzae</i> : Couple modèle pour les interactions plantes / agents pathogènes	p.4
1-2-1) <i>Magnaporthe oryzae</i>	p.4
1-2-2) Le riz	p.4
1-3) Interaction gène de résistance <i>Pi33</i> / gène d'avirulence <i>ACE1</i>	p.5
1-3-1) Le gène d'avirulence <i>ACE1</i> de <i>M. oryzae</i>	p.5
1-3-2) Le gène de résistance <i>Pi33</i> du riz	p.5
1-4) Objectifs	p.6

2) Recherche de mutants et caractérisation de <i>Pi33</i>	p.7
2-1) Matériels et méthodes	p.7
2-1-1) Matériels biologiques et cultures	p.7
2-1-2) Evaluation phénotypique	p.8
2-1-3) Caractérisation des mutations	p.8
2-2) Résultats	p.9
2-2-1) Criblage phénotypique de la banque de mutants	p.9
2-2-2) Caractérisation des mutants	p.10
2-3) Discussion	p.11

3) Sous clonage des clones BAC 33B02 et 44H23	p.13
3-1) Matériels et méthodes	p.13
3-1-1) Digestion des clones BAC et du vecteur	p.13
3-1-2) Ligation des produits de digestion	p.13
3-1-3) Transformation du plasmide recombinant dans <i>E. coli</i>	p.14
3-1-4) Vérification des colonies transformées	p.14
3-2) Résultats et Discussion	p.15

4) Conclusion	p.17
----------------------	------

Bibliographie

Annexes

I) Présentation de l'entreprise

Le CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) est un institut français de recherche agronomique au service du développement des pays du Sud et de l'outre-mer français. Le Cirad est un établissement public à caractère industriel et commercial (Epic). Il emploie 1 820 personnes, dont 1 050 cadres. Son budget opérationnel s'élève à 200 millions d'euros. Il comprend 3 départements et 62 unités. Le Cirad intervient dans plus de 50 pays dans le monde.

Le Cirad a choisi le développement durable comme ligne de force de son action à travers le monde. Cette démarche prend en compte les conséquences écologiques, économiques et sociales, à long terme, des processus de transformation des sociétés et des territoires du Sud. Le Cirad intervient par des recherches et expérimentations, des actions de formation, d'information et d'innovation, et des expertises. Ses compétences relèvent des sciences du vivant, des sciences humaines et des sciences de l'ingénieur, appliquées à l'agriculture et l'alimentation, à la gestion des ressources naturelles et aux sociétés.

La majorité des recherches menées par le Cirad se fait en partenariat. Les programmes que les chercheurs conduisent avec leurs partenaires sont conçus et réalisés en commun. Les partenaires du Cirad sont nombreux et variés.

L'équipe d'accueil au sein de l'Unité Mixte de Recherche (INRA/CIRAD/SupAgroM) BGPI (Biologie et Génétique des interactions plantes-parasites pour la Protection Intégrée) a pour thématique principale l'identification des mécanismes de défenses qui interviennent dans la résistance du riz à la pyriculariose. Cette maladie est causée par le champignon, *Magnaporthe oryzae*. Un des objectifs de l'équipe est de mieux comprendre les phénomènes de contournement des résistances spécifiques. Les études réalisées portent sur la caractérisation génétique et moléculaire des interactions riz / *M. oryzae* et sur l'évolution des populations de l'agent pathogène. En ce qui concerne la caractérisation génétique des mécanismes de défense du riz, les objectifs sont d'établir des liens fonctionnels entre différentes formes de résistance, d'identifier des régulateurs des réactions de défense du riz, d'évaluer l'origine et l'amplitude de la diversité des réactions de défense et d'établir une carte physique de l'arsenal de défense du riz.

L'objectif de l'équipe n'est pas de faire de la création variétale mais de fournir des outils utilisables en amélioration variétale ou de tester de nouvelles approches à partir de résultats obtenus sur la caractérisation des interactions, en vue d'une résistance durable.

II) Enjeux socio-économiques

La pyriculariose constitue une menace pour la sécurité alimentaire. Elle est présente dans toutes les zones où le riz est cultivé. Cette maladie peut-être particulièrement destructrice dans certaines conditions, en particulier, en situation de culture pluviale traditionnelle ou irriguée avec de forts intrants azotés (Teng *et al*, 1991).

Au niveau mondial, la production annuelle de riz depuis 1999 est de l'ordre de 600 millions de tonnes (source FAO). Les pertes dues à la pyriculariose ont été chiffrées par Baker *et al* (1997) à 157 millions de tonnes sur la période 1975-1990, soit une perte annuelle de 2,5% sur 15 ans. L'importance de cette maladie peut aussi être appréhendée en observant que, sur la période 1980-1990, 2 à 9 millions d'hectares ont été traités avec des fongicides en Chine. Dans certains cas, la pyriculariose aboutit à une perte importante de production, à l'échelle de toute une région agricole avec comme exemple la région d'Uznuk en Turquie en 1995. Vingt pour cent de la récolte ont été perdus sur une surface de 25 000 hectares, certains agriculteurs n'ayant même pas pu récolter de grain.

III) Situation du projet dans la thématique de l'équipe

Actuellement, les méthodes de lutte utilisées ne sont pas totalement efficaces. L'usage répété de fongicides contre cette maladie présente plusieurs inconvénients : développement de résistances de la part du champignon, effets sur l'environnement, coût. Par ailleurs, la mise au point de variétés commerciales de riz munies d'une résistance durable à la pyriculariose se montre difficile, en particulier, du fait d'une connaissance très partielle concernant les mécanismes d'interaction entre la plante et le champignon.

Mon projet consiste à contribuer au clonage d'un gène de résistance du riz : *Pi33*. En combinaison avec deux autres gènes de résistance, ce gène confère un large spectre de résistance aux souches de *Magnaporthe oryzae*. Il correspond au gène d'avirulence *ACE1* qui a été cloné (Böhnert *et al*, 2004). Le clonage de *Pi33* offre donc la perspective d'étudier au niveau moléculaire l'interaction *ACE1* / *Pi33*. Actuellement, peu de couples gène d'avirulence fongique / gène de résistance sont caractérisés. La majorité des couples proviennent de l'interaction tomate / *Cladosporium fulvum* et seulement un seul de l'interaction riz/ *M.oryzae* (*Pita* / *AvrPita*). Pour cloner le gène de résistance *Pi33*, nous mettrons en œuvre

deux approches utilisées au sein de l'équipe : la recherche de mutants par criblage d'une collection et le sous clonage de clones d'ADN génomique.

Agent Pathogène	Plante	
	R	r
Avr	Incompatible	Compatible
avr	Compatible	Compatible

Figure 1 : Schématisation de la relation gène-pour- gène.

R = gène de résistance

Avr = gène d'avirulence

1) Contexte général

1-1) Les interactions plantes / microorganismes phytopathogènes

1-1-1) Types d'interactions et modèles

Les plantes ont développé, au cours de l'évolution, des stratégies de défense vis-à-vis de leurs agresseurs. Lors d'une interaction entre une plante et un microorganisme phytopathogène, nous pouvons distinguer deux cas :

- les interactions **non hôte** concernent les cas où l'agent pathogène est incapable d'infecter une plante. Cette interaction est définie comme étant un mécanisme de résistance non contourné par tous les individus d'une espèce pathogène donnée.

- les interactions **hôtes** sont celles où l'agent pathogène possède toutes les armes requises pour infecter une plante. On distingue les **interactions compatibles** où des symptômes caractéristiques de la maladie se développent. La plante, dans ce cas, est dite sensible et l'agent pathogène est virulent. Au contraire, les **interactions incompatibles** impliquent une reconnaissance précoce de l'agent pathogène par la plante qui permet à celle-ci de stopper l'invasion de l'agent pathogène grâce à une réaction dite hypersensible. La plante est dite résistante et l'agent pathogène est dit avirulent.

Flor (1971) a décrit l'existence de résistances spécifiques monogéniques dans l'interaction lin / *Melampsora lini* et a énoncé la théorie dite **gène-pour-gène**. Dans ce type d'interaction, les résistances sont contrôlées par des gènes de résistances (gènes *R*) auxquels correspondent des gènes d'avirulence chez l'agent pathogène. Le gène de résistance est généralement dominant (*R*). De même, le gène d'avirulence est dominant (*Avr*). Lorsqu'un organisme pathogène *Avr* infecte une plante *R*, la réaction est **incompatible**. Dans tous les autres cas, l'agent pathogène se développe et les symptômes de la maladie sont observés, la réaction est **compatible** (Figure 1).

Lors d'une réaction incompatible, la réaction de défense de la plante passe par trois phases. La première étape est la reconnaissance de l'agent pathogène avec l'interaction directe ou indirecte des produits du gène de résistance et du gène d'avirulence. Ensuite, une cascade d'événements va entraîner la transduction du signal. Ce signal conduira à la mise en place des mécanismes de défenses, dont la réaction hypersensible qui entraîne la mort cellulaire programmée des cellules infectées ainsi que la mort de l'agent pathogène.

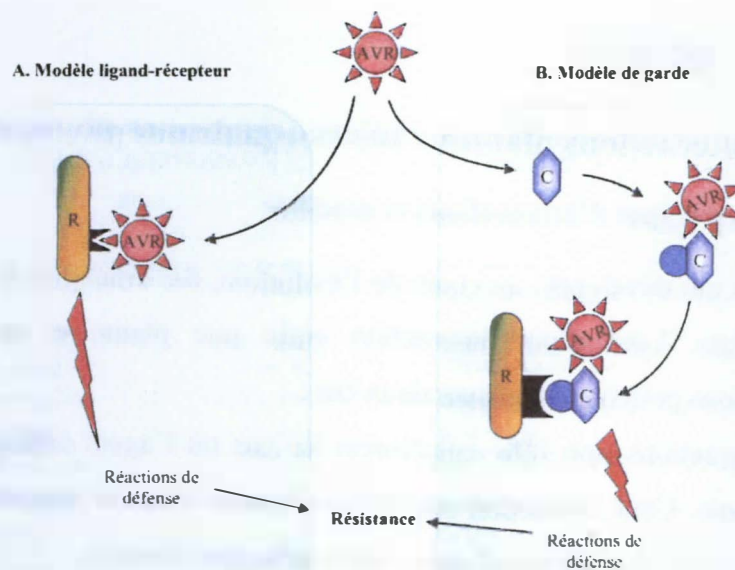


Figure 2 : Modèles biochimiques de la relation gène-pour-gène (Collemare, 2007).

- La protéine de résistance R se fixe sur la protéine d'avirulence AVR. L'interaction entre ces deux protéines déclenche la cascade de signalisation aboutissant à l'activation des gènes de défenses.
- La protéine AVR se fixe sur une protéine cible C, interaction qui peut induire un changement de conformation. Ce changement permet à la protéine R de reconnaître la protéine C et de conduire à l'activation des gènes de défenses.

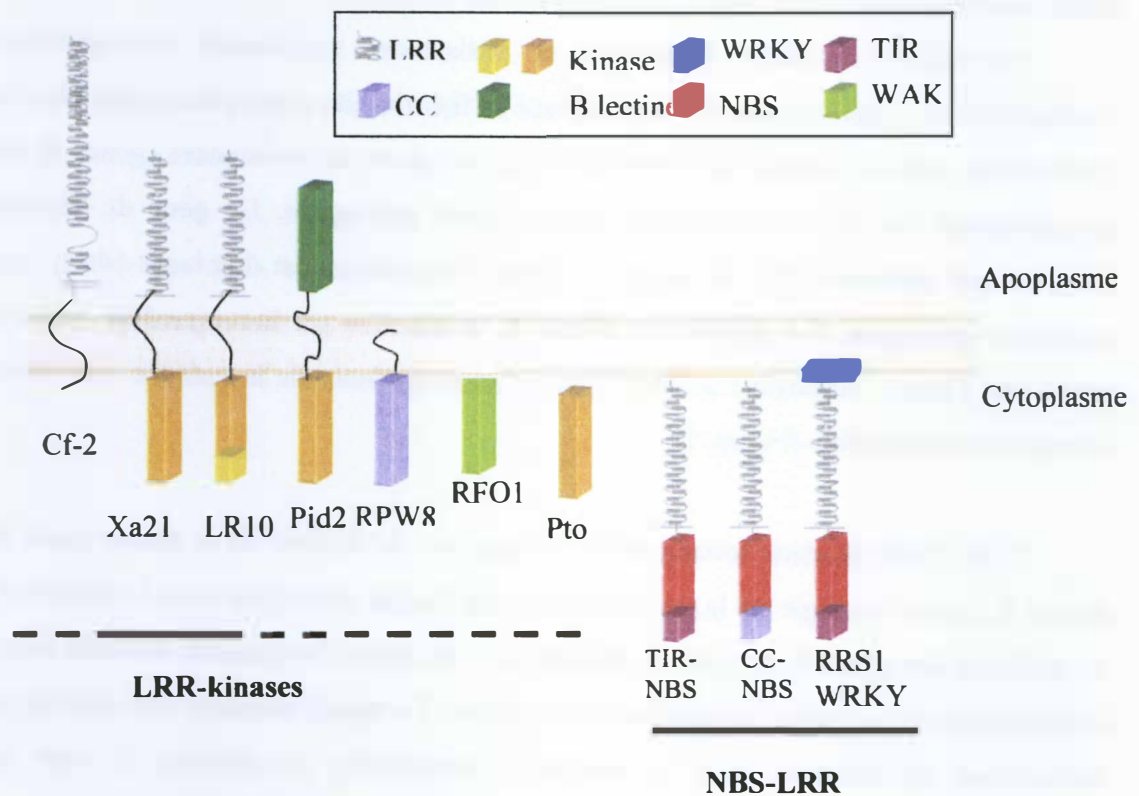


Figure 3 : Les grandes classes de protéines codées par les gènes de résistance des plantes.

Du point de vue biochimique, la reconnaissance de la protéine d'avirulence par la protéine de résistance peut-être interprétée selon deux théories :

- Le **modèle ligand récepteur** (Staskawicz *et al.*, 1995) : le récepteur est codé par le gène *R* et le ligand est codé par le gène *Avr*. Dans ce modèle, la protéine d'avirulence est reconnue directement par la protéine de résistance et il en résulterait l'initiation de la cascade de signalisation des voies de défenses (Figure 2). C'est le cas de l'interaction riz / *M. oryzae* : *Pita* / *AvrPita* (Jia *et al.*, 2000).

- Le **modèle de garde** (Dangl et Jones, 2001) : dans ce modèle, les produits des gènes de résistances ne reconnaissent pas directement les produits des gènes d'avirulence. Les protéines *R* reconnaîtraient un complexe protéine gardée / protéine d'avirulence. Dans le modèle le plus simple, la fixation de la protéine d'avirulence sur la protéine gardée induit un changement de conformation de celle-ci (Figure 2). L'étude de l'interaction *Arabidopsis Thaliana* / *Pseudomonas syringae* a révélé que la protéine de résistance RPM1 n'interagit pas directement avec la protéine d'avirulence AVRPM1 mais aurait besoin de la protéine RIN4 pour la reconnaissance de l'agent pathogène (Mackey *et al.*, 2002).

1-1-2) Les types de gènes de résistance

Actuellement, une cinquantaine de gènes conférant une résistance spécifique à des virus, bactéries, champignons et nématodes, a été isolé chez de nombreuses plantes, par clonage positionnel ou mutants d'insertion (Martin *et al.*, 2003). En simplifiant, le gène de résistance idéal est composé de deux parties : une partie pour la reconnaissance et une autre pour la signalisation. En fonction de ces deux types de domaines, les gènes de résistances peuvent être classés en deux groupes majeurs (Figure 3) :

Les NBS-LRR

Cette classe de gènes est la plus répandue dans le monde végétal. Elle est composée d'un domaine LRR (Leucine Rich Repeat), côté N-terminal, qui est un domaine d'interaction protéine-protéine et jouerait un rôle dans la reconnaissance de l'agent pathogène. Le domaine NBS, côté C-terminal, jouerait plus un rôle dans la transduction du signal. Ces gènes sont généralement intracellulaires. D'autres motifs protéiques, ayant aussi un rôle dans la signalisation, peuvent venir s'ajouter au domaine NBS-LRR comme des domaines de type CC (Coiled Coiled) ou LZ (Leucine Zipper) sur la partie C-terminale. Dans l'interaction riz / *M. oryzae*, la plupart des gènes clonés appartiennent à cette famille (*Pib*, Wang *et al.*, 1999 ; *Pita*, Bryan *et al.*, 2000 ; *Pi2*, Zhou *et al.*, 2006 ; *Pi9*, Qu *et al.*, 2006 ; *Pi36*, Liu *et al.*, 2007).

En partie C-terminal, certains gènes ont un domaine TIR (Toll-Interleukine). Les gènes *RPP1*, *RPP25* et *RPP5* dans l'interaction *Arabidopsis thaliana*/ *Peronospora parasitica* en sont des exemples. Aucun gène avec un domaine TIR n'a été identifié chez les monocotylédones. Un facteur de transcription de type WRKY peut également être identifié en partie N-terminal. C'est le cas de la protéine RRS1R dans l'interaction *Arabidopsis thaliana*/ *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2002).

Les LRR-Kinases

Comme les NBS-LRR, les LRR-Kinases possèdent deux domaines : un domaine pour la reconnaissance (LRR) et un autre pour la signalisation (domaine Kinase). Des gènes clonés, ce groupe est le plus diversifié au niveau de la structure des protéines de résistance. Beaucoup de ces gènes de résistance présentent un domaine transmembranaire (TM) qui sert d'ancrage dans la membrane. Cette classe de gène de résistance peut-être divisé en sous-classes. Les **LRR-TM-Sérine-Thréonine Kinases** sont représentées par plusieurs gènes bien caractérisés : *Xa21* (Song *et al.*, 1995), *Xa26* dans l'interaction riz / *Xanthomonas oryzae* et *LRK10* de l'interaction blé / *Puccinia triticina* (Feuillet *et al.*, 1997). Les **Beta-lectine-TM-Sérine-Thréonine Kinases** sont représenté par *Pid2* dans l'interaction Riz/*M. oryzae* (Chen *et al.*, 2006). Le domaine LRR est remplacé par une β -lectine.

Chez les sous-classes de gènes suivantes, un des deux domaines est absent. Les **LRR-TM** ne sont connus que dans l'interaction tomate / *Cladosporium fulvum* (*Cf4*, *Cf5*, *Cf9*) (De Witt et Joosten, 1999). Cette sous-classe de gènes ne comporte pas de kinase. Les **WAK-kinases** présentent une kinase de type WAK intracellulaire. Le gène *RFO1* dans l'interaction *Arabidopsis thaliana* / *Fusarium* représente cette famille (Diener *et al.*, 2005). Les **Sérine-Thréonine Kinases** ne comportent qu'un domaine kinase intracellulaire. Un seul gène appartient à cette classe. Il s'agit de *Pto* dans l'interaction tomate / *Pseudomonas syringae* (Martin *et al.*, 1993). Dans ces trois classes de gène de résistance, il est possible que d'autres gènes remplissent la fonction du domaine manquant.

Cette vue de la fonction des protéines de reconnaissance est très simpliste car en réalité, les fonctions de ces protéines sont beaucoup plus complexes. Par exemple, le gène de résistance *Pto* est une kinase qui joue un rôle dans la reconnaissance de l'agent pathogène et pas dans la transduction du signal qui est assurée par Prf (Salmeron *et al.*, 1998).

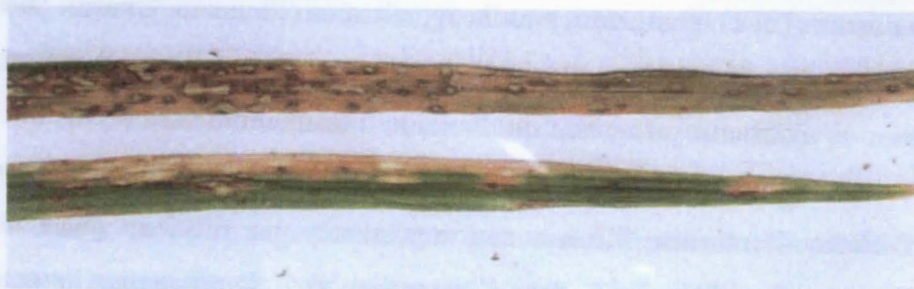
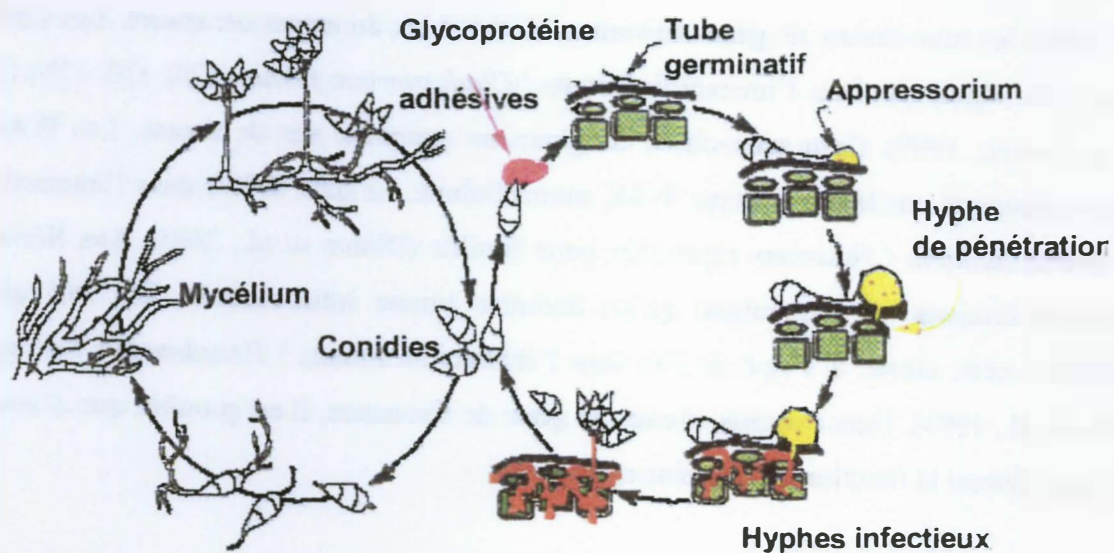


Figure 4 : Symptômes et dégâts provoqués par *Magnaporthe oryzae* sur la culture de riz.
Symptômes sur panicules et dégâts au champ en Camargue et sur feuille.
Photos : D. Tharreau



Cycle asexué

Cycle infectieux

Figure 5 : Cycle biologique de *Magnaporthe oryzae* (Collemare, 2007).

1-2) Riz / *Magnaporthe oryzae* : Couple modèle pour les interactions plantes / agents pathogènes

1-2-1) *Magnaporthe oryzae*

Magnaporthe oryzae (Hebert) Barr. est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Pyrénomycètes. Cette espèce est capable d'infecter plus de 50 espèces de graminées dont certaines d'importance économique comme le riz, l'orge, le blé. Elle est responsable de l'une des plus importantes maladies du riz, la pyriculariose. *M. oryzae* peut s'attaquer aussi bien aux feuilles qu'aux tiges et aux inflorescences du riz. Au niveau des feuilles, les symptômes se présentent sous forme de lésions elliptiques grisâtres (Figure 4). Deux cycles de reproduction de *M. oryzae* sont connus : un cycle de reproduction asexué (anamorphe *Pyricularia grisea*) et un cycle de reproduction sexué (télomorphe *Magnaporthe oryzae*). Le cycle sexué permet des analyses génétiques en laboratoire mais n'a encore jamais été observé dans la nature. La production de spores permet la dissémination de la maladie (Figure 5).

M. oryzae constitue une espèce modèle pour l'étude des interactions plantes / champignons pathogènes (Ebbole, 2007). En effet, l'intégralité du cycle biologique peut être reproduit *in vitro*. Le mycélium est obtenu aussi bien en culture liquide que sur milieu gélosé. Des spores peuvent être produites sur milieu artificiel et permettre de reproduire les symptômes de la pyriculariose sur plants de riz entiers. La manipulation du génome de *M. oryzae* est possible et relativement aisée. Des outils de génomique et de génétique sont disponibles (mutagenèse insertionnelle, complémentation, remplacement de gène...). De plus, le génome de *M. oryzae* est entièrement séquencé (Dean *et al.*, 2005).

1-2-2) Le riz

Le genre botanique *Oryza* regroupe des riz sauvages et des riz cultivés. Ce sont des monocotylédones de la famille des Poacées. *Oryza sativa* est l'espèce la plus cultivée dans le monde. Cette espèce est subdivisée en deux sous espèces principales : *indica* et *japonica*.

Le riz est une plante de grande culture mais aussi la plante modèle des monocotylédones. C'est une plante diploïde et autogame, relativement facile à transformer génétiquement, ce qui simplifie son étude génétique. De plus, le riz comporte un génome de petite taille (420-460 Mb) ce qui a permis de le séquencer. Deux programmes de séquençages ont été réalisés : sur la variété *japonica* Nipponbare (Goff *et al.*, 2002) et sur la variété *indica*

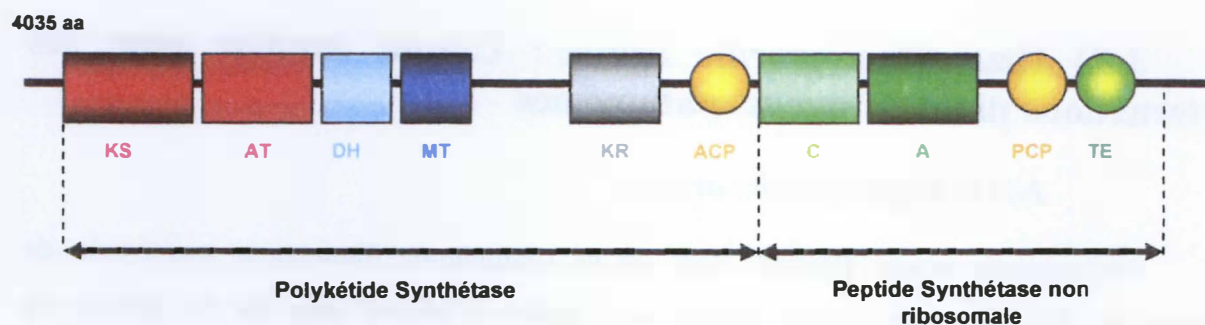


Figure 6 : Organisation des domaines catalytiques d'Ace1. (Collemare, 2007)

KS : β -Ketoacyl Synthase ; AT : Acyle-Transférase ; DH : DésHydratase ; MT : Méthyle-Transférase ; KR : β -KetoReductase ; ACP : Acyl Carrier Protein ; C : Condensation ; A : Adénylation ; PCP : Peptidyl Carrier Protein .

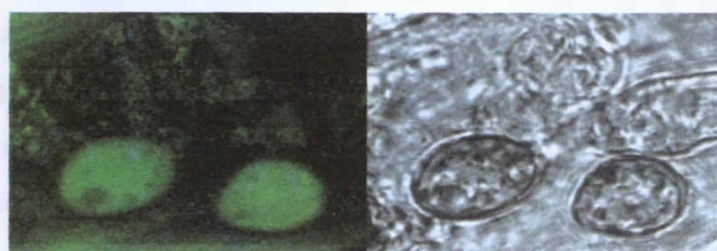


Figure 7 : Expression du gène *ACE1* et localisation cellulaire de la protéine. (Böhnert *et al*, 2004)

Une fusion traductionnelle entre la protéine Ace1 et la protéine de la GFP a été réalisée. Les appressoria différenciés sur feuille d'orge ont été observés au microscope 24h après infection (Grossissement x400). La fluorescence est localisée dans le cytoplasme des appressoria.

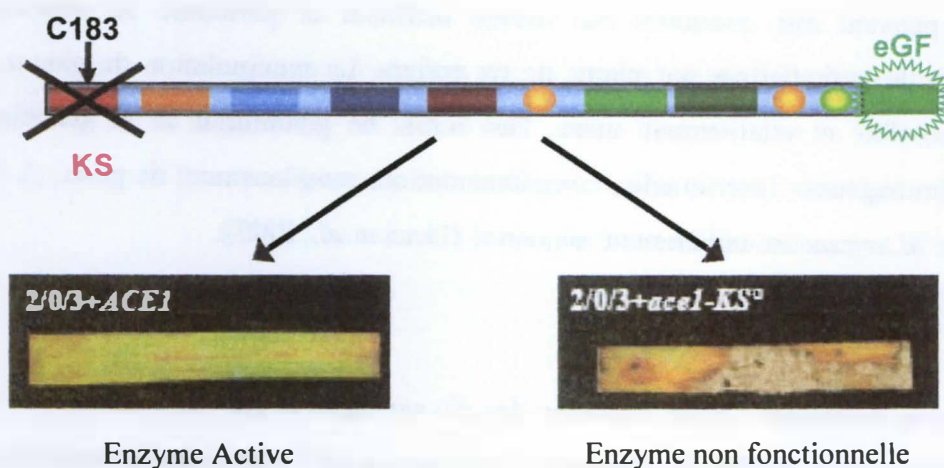


Figure 8 : La fonction enzymatique d'Ace1 est requise pour la reconnaissance par le riz. (Böhnert *et al*, 2004)

Un allèle sauvage et un allèle muté d'*ACE1* ont été introduits dans la souche virulente 2/0/3. Les transformants ont été inoculés sur le cultivar de riz résistant possédant le gène *Pi33*. Les symptômes ont été observés à 6 jours après infection.

93-11 (Yu *et al.*, 2002). De plus, de nombreuses banques d'ADN génomique et des collections de mutants sont disponibles.

1-3) Interaction gène de résistance *Pi33* / gène d'avirulence *ACE1*

1-3-1) Le gène d'avirulence *ACE1* de *M. oryzae*

Le gène d'avirulence *ACE1* (Avirulence Conferring Enzyme 1) a été identifié par clonage positionnel (Böhnert *et al.*, 2004). Ce gène code une enzyme de 4 025 acides aminés qui présente des structures typiques d'un domaine polykétide synthétase (PKS) et d'un domaine peptide synthétase non ribosomal (NRPS) (Figure 6). Ces deux classes d'enzymes sont impliquées dans la production de métabolites secondaires. Böhnert *et al.* (2004) ont montré que le produit du gène *ACE1* n'était pas sécrété dans la cellule hôte. Des expériences de fusion avec un rapporteur GFP ont montré que la protéine *ACE1* se trouve dans le cytoplasme des appressoria et des hyphes infectieux primaires (Figure 7). Böhnert *et al.* (2004) ont montré que la fonction enzymatique d'*ACE1* est essentielle pour la reconnaissance par les cultivars de riz, et que la protéine elle-même n'est pas le signal d'avirulence (figure 8). La protéine *ACE1* n'est donc pas directement en contact avec la protéine du gène de résistance *Pi33*. L'hypothèse actuellement avancée est que la protéine *ACE1* catalyserait la synthèse d'un petit métabolite secondaire qui serait excrété, puis reconnu par une protéine de résistance du riz. *ACE1* est un gène d'avirulence original puisque la plupart des gènes d'avirulence clonés codent de petits peptides, sécrétés, de fonction inconnue (Collemare, 2007).

1-3-2) Le gène de résistance *Pi33* du riz

Le caractère monogénique de la résistance correspondant à *ACE1* a été établi (Berruyer *et al.*, 2002). *Pi33* a été cartographié génétiquement sur le bras court du chromosome 8 entre les marqueurs RMSPi33-53 et RM3507 dans un intervalle de 0.5 cM (Figure 9). Grâce aux données de séquençage de la variété de riz Nipponbare, la carte physique de cette région a pu être déterminée *in silico*. Le gène *Pi33* a été localisé dans une zone de 240 Kb (Ballini *et al.*, 2007). La séquence du génome de cette variété dans la zone définie par cartographie

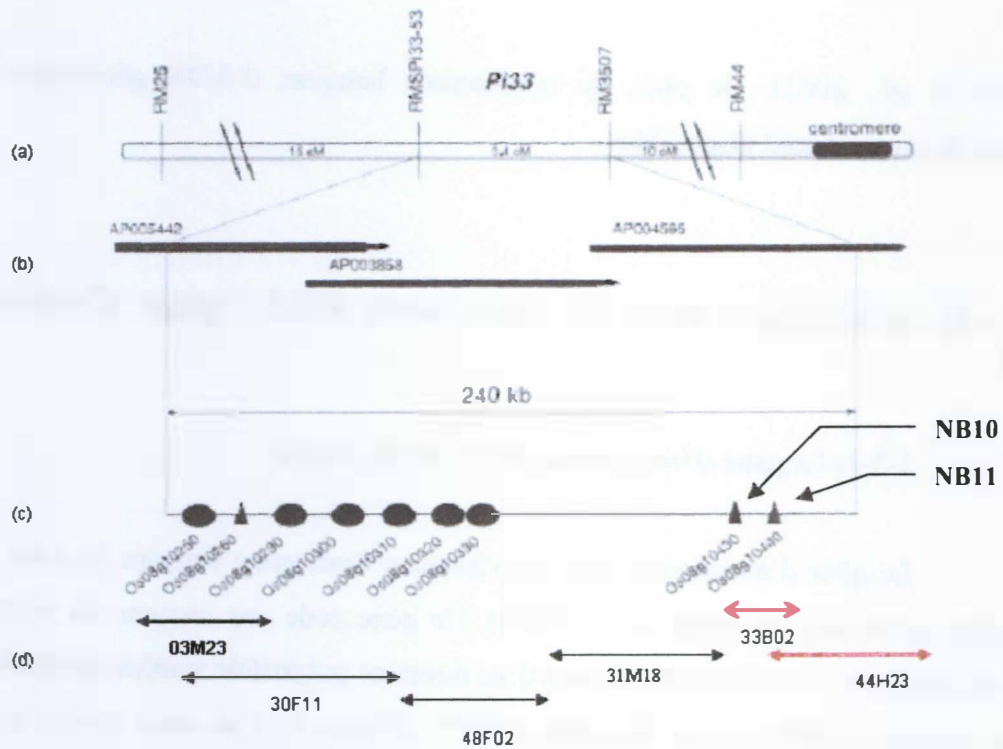


Figure 9 : Cartographie génétique et physique de *Pi33*. (d'après Ballini *et al*, 2007)

- (a) Cartographie génétique de *Pi33* réalisée avec des descendants du croisement IR64 x Azucena. La distance génétique est exprimée en cM.
- (b) Assemblage de clones BAC de Nipponbare entourant la région de *Pi33*.
- (c) Analogues de gènes de résistance du cluster de *Pi33*. La prédiction et le nombre de gènes a été obtenu sur TIGR. Les LRR-Kinases sont représentées par des ronds noirs et les NBS-LRR par des triangles.
- (d) Clones BAC d'IR64 couvrant la région de *Pi33*.
Flèches rouges : clones BAC étudiés dans le stage.

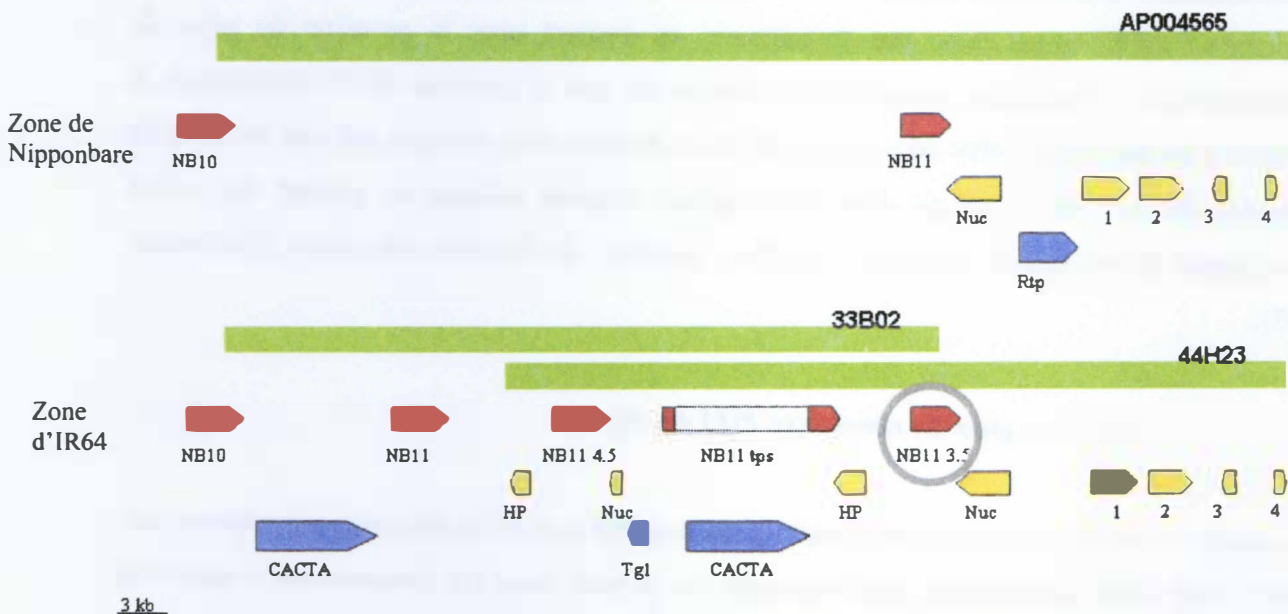


Figure 10 : Annotation de la partie droite de la carte génétique de *Pi33* correspondant aux clones BAC IR64 33B02 et 44H23 chez IR64 et Nipponbare.

En rouge les gènes candidats de type NBS-LRR, en jaune les autres gènes, en bleu les éléments transposables.

HP= Protéine Hypothétique, Nuc= Similaire au Transporteur de Nucleoside Os08g10450, 1= Similaire à Os08g10470, 2= Similaire à Os08g10480, 3= Similaire à Os08g10490, 4= Similaire à Os08g10500, CACTA = Transposon de type CACTA type, Tgl = Retrotransposon de type Tgl, Rtp : Retrotransposon
Rond gris= Gène candidat

génétiq ue a été annotée. Cette zone de 240kb contient 23 gènes dont neuf gènes candidats qui pourraient correspondre à *Pi33* : trois homologues de gènes de résistance de type NBS-LRR et six LRR-kinases formant un cluster. C'est une figure classique des gènes de résistance (Monosi *et al.*, 2004). Les LRR-kinases de ce cluster n'appartiennent pas aux phylum des LRR-kinases identifiés comme gène de résistance jusqu'à maintenant (Dardick *et al.*, 2006). Les LRR-kinases de cette zone sont donc *a priori* des moins bons candidats pour *Pi33*. Les NBS-LRR sont donc considérées comme les candidats les plus probables. Mais, la variété de riz Nipponbare ne possède pas *Pi33*. Afin d'isoler *Pi33*, une cartographie physique chez une variété résistante, IR64, a été réalisée. Grâce à une banque de clones BAC d'IR64 (Bacterial Artificial Chromosome), la zone de 240 Kb chez Nipponbare a pu être couverte (Figure 9). La séquence d'un clone BAC d'IR64 couvrant la partie gauche de cette zone confirme l'existence d'un gène de type NBS-LRR(Os08g10260). Mais les données d'expression ont révélé que ce gène ne s'exprime pas lors de l'interaction. Les deux candidats restant se situent sur les clones BAC 33B02 (60 Kb), 44H23 (100Kb) et 31M18 (80 Kb) (Figure 9). Un premier programme de séquençage a permis d'obtenir une première partie de séquences de deux clones BAC, 33B02 et 44H23. Bien que ces séquences soient incomplètes, au moins deux nouveaux candidats de type NBS-LRR (NB11 3.5 et NB11 4.5) apparaissent dans l'analyse de la séquence chez IR64, ainsi que des copies tronquées de cette NBS-LRR (Figure 10).

1-4) Objectifs

L'objectif du stage est d'identifier et de cloner le gène de résistance du riz *Pi33*. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en place deux approches :

(1) Une approche avec *a priori* : cette stratégie s'appuie sur l'hypothèse qu'un des gènes candidats que nous avons identifié est bien *Pi33*. Nous chercherons des mutants sensibles dans une banque de mutants d'une variété possédant *Pi33*, C101Lac. Les gènes candidats seront ensuite séquencés chez les mutants pour rechercher un polymorphisme avec la variété C101Lac.

(2) Une approche sans *a priori*. Le sous clonage des clones BAC couvrant la zone de *Pi33* chez la variété résistante IR64, nous permettra d'accéder à tous les gènes susceptibles d'être *Pi33*. Nous digérerons ces clones pour avoir de plus petits fragments. Une digestion complète des clones BAC avec une enzyme ne coupant pas à l'intérieur des gènes cibles est

employée. Ces fragments seront ensuite introduits par transformation dans une variété sensible. Les sous clones donnant des transformants résistants seront recherchés.

2) Recherche de mutants et caractérisation de *Pi33*

2-1) Matériels et méthodes

2-1-1) Matériels biologiques et cultures

L'expérimentation porte principalement sur un génotype de riz : C101Lac. Cette variété résistante de type *indica* n'est pas utilisée en grande culture. C101Lac est une lignée isogénique de la variété Co39 obtenue à l'IRRI (International Rice Research Institute). C101Lac porte les gènes de résistances *Pi1* et *Pi33* (Berruyer *et al.*, 2003). Une autre lignée isogénique de Co39, C104 Lac ne contient que le gène de résistance *Pi1*.

Afin de créer des mutants de *Pi33*, une population de lignées mutantes a été créée à partir de la variété C101Lac par traitement à l'EMS (Ethyl Methane Sulfonate). Les graines de C101Lac ont été traitées avec une concentration de 90mM d'EMS.

Les lignées de riz sont cultivées dans un mélange de terreau et de pouzzolane (Annexe 1). Les semis sont réalisés dans des terrines de semis de 30 × 50 × 7 cm à raison de 16 lignes de graines et de 20 graines par ligne. Nous semons 20 graines par ligne pour détecter au moins une plante mutante dans chaque lignée mutée pour la résistance contrôlée par *Pi33*. En effet, en suivant les règles mendéliennes et en considérant que la mutation est récessive, en théorie, une ségrégation de trois quarts de phénotype sauvage et un quart de phénotype mutant est attendue en génération M2. Mais, lors du développement de la graine, seulement quatre cellules participent à la formation des graines de la génération suivante. Donc, si une seule de ces cellules porte la mutation observée, la proportion de plantes mutantes devient :

$$(1/4)/4 = 0.0625$$

Soit 1.25 plantes mutantes / 20 graines

Donc en semant 20 graines pour chaque lignée, la probabilité de détecter une mutation dans une lignée est d'environ 40 % (probabilité estimée à partir d'une loi binomiale).

Concernant le matériel fongique, nous avons utilisé deux souches de *M. oryzae*. La souche BG1 provient du Bangladesh et est avirulente vis-à-vis de *Pi33*. Cette souche nous permettra de détecter des mutants sensibles. La souche CD69 provient de Côte d'Ivoire et est

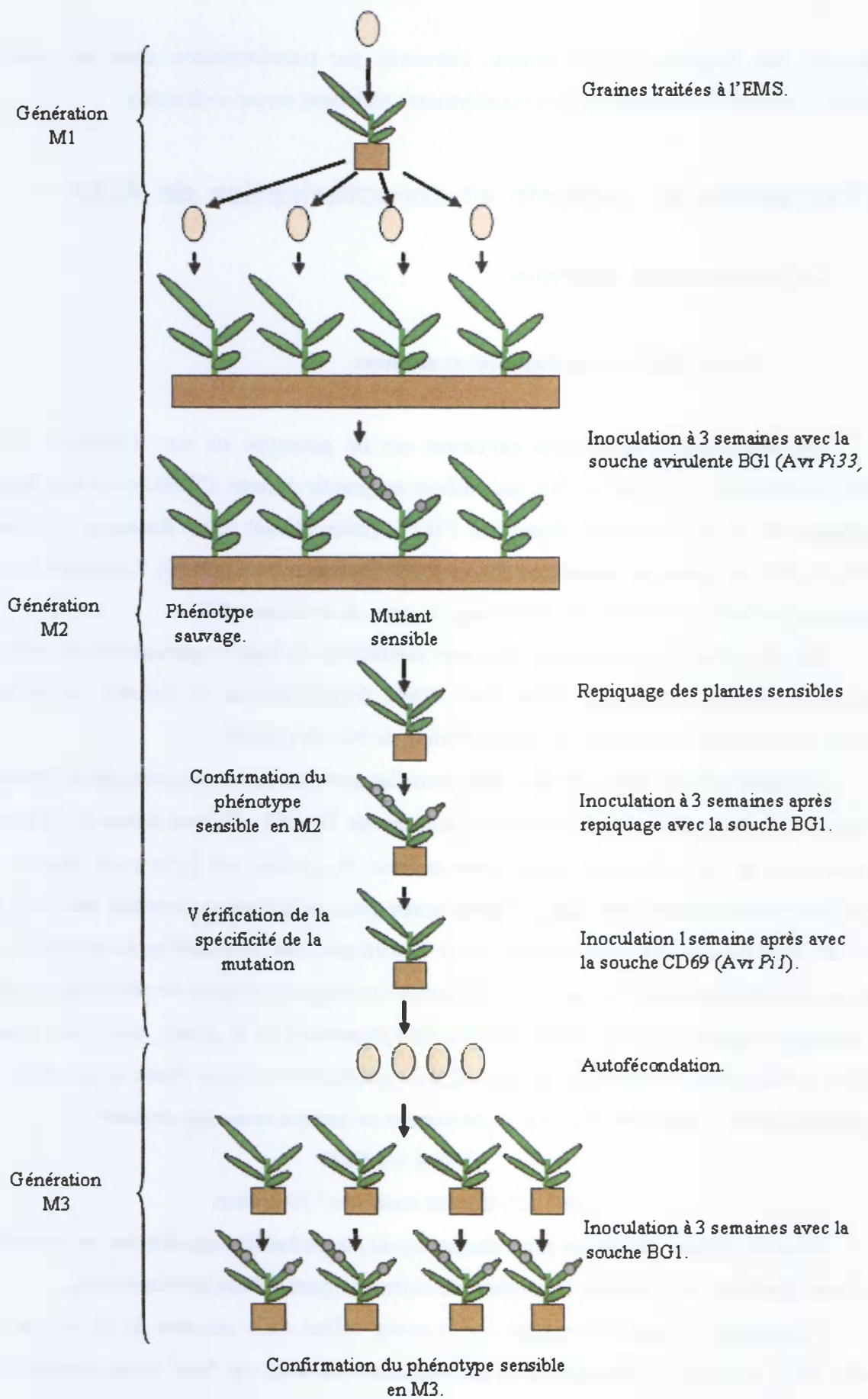


Figure 11 : Schéma récapitulatif du criblage de la banque de mutants C101 Lac

avirulente vis-à-vis de *Pil* mais virulente vis-à-vis de *Pi33*. CD69 nous permettra de tester la spécificité des mutants identifiés.

Les souches de *M. oryzae* sont cultivées 10 jours sur milieu farine de riz (Annexe 2) à 28°C, avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12h/12h. Les boîtes sont scellées afin de limiter l'évaporation.

2-1-2) Evaluation phénotypique des mutants de riz

Les lignées M2 de mutants C101Lac ont été criblées par une inoculation avec la souche avirulente BG1 (Figure 11). Les plantes mutantes M2 plus sensibles que le témoin résistant C101Lac, lors de cette première inoculation, ont été maintenues en culture. La sensibilité est évaluée par rapport à deux témoins : C101Lac, résistant à BG1 et CD69 et C104 Lac, sensible à BG1 mais résistant à CD69. Une deuxième inoculation avec la souche BG1 est effectuée pour confirmer les phénotypes retenus lors de la première inoculation. Puis, une troisième inoculation a été effectuée avec la souche CD69 qui est avirulente pour un autre gène de résistance (*Pil*) impliqué dans l'interaction riz / *M. oryzae*. Cette inoculation nous permet de déterminer si la mutation est spécifique du gène de résistance *Pi33*. Les mutants confirmés ont ensuite été multipliés par autofécondation afin d'obtenir une population M3. Cette population a été semée et inoculée avec la souche BG1 pour confirmer le phénotype sensible (Figure 11).

2-1-3) Caractérisation des mutations

L'objectif de cette étape est de vérifier que les phénotypes mutants observés correspondent à des mutations dans un gène de type NBS-LRR qui nous paraît être le meilleur candidat (NB11 3.5) de la zone identifiée génétiquement. Cette vérification se fait par séquençage du gène chez les mutants et comparaison avec la séquence sauvage de C101Lac.

Une extraction d'ADN a été réalisée sur tous les mutants sensibles repérés en M2 selon le protocole de Berruyer *et al.* (2003) (Annexe 3).

La définition d'amorces spécifiques pour le gène cible étant difficile (famille multigénique), nous avons procédé en plusieurs étapes pour le séquençage des mutants M2 sensibles. Tout d'abord, une PCR « long range » a été effectuée avec des amorces externes au gène (IR64_cDNA NB11F et R, Annexe 4) permettant d'amplifier toute la séquence du gène NB11 3.5 de C101Lac. Un amplicon de 3,5 Kb est attendu. La taille du produit PCR étant trop grande et la quantité du produit n'étant pas assez concentrée pour le séquençage, nous

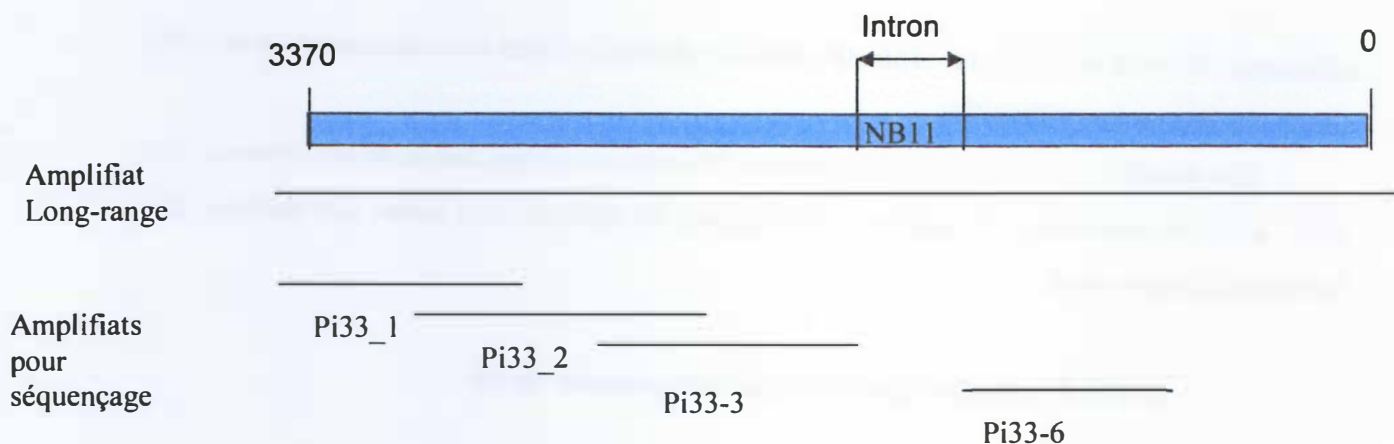


Figure 12 : Principe des PCR pour le séquençage du gène cible

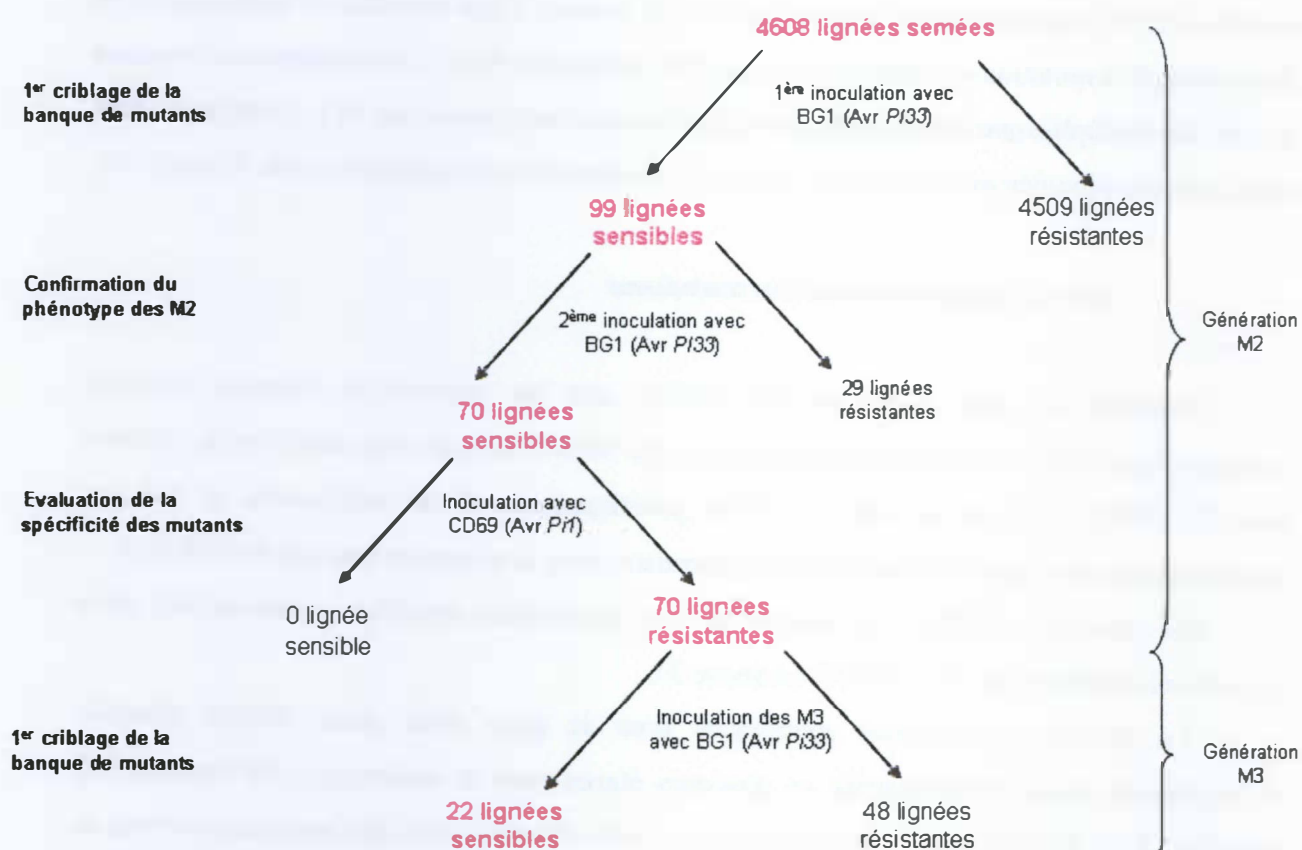


Figure 13 : Résultats du criblage de la banque de mutant

réalisons ensuite quatre PCR sur ce produit PCR avec 4 couples d'amorces ciblant les exons du gène candidat. Cette deuxième série de PCR permet de couvrir plus des deux tiers du gène (Figure 12). Les produits de ces deuxièmes PCR ont été séquencés par la société Génome express. Les données de séquençage sont analysées par le logiciel Staden Package (<http://www.sanger.ac.uk/Software/production/staden/>) pour l'alignement des séquences et la qualité des chromatogrammes envoyés par Génome express. La traduction des séquences nucléotidiques en acides aminés a été effectuée sur le site Expasy (<http://expasy.org>). L'alignement des séquences d'acides aminés est réalisée avec le logiciel ClustalW (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html) (Thompson *et al.*, 1994).

2-2) Résultats

2-2-1) Criblage phénotypique de la banque de mutants

Nous avons semé 4 608 lignées M2 (Figure 13). L'observation des plantes avant inoculation nous a permis d'observer dans certains cas un phénotype de croissance accélérée des entrenœuds. Ce type de mutants porte le nom de mutants « slender ». Ces lignées présentent une mutation dans le gène *SLR1*, entraînant une réponse constitutive à la gibbérelline (Ikeda *et al.*, 2001). Une seule copie de ce gène est connue chez le riz. Trois lignées mutantes (0.06%) ont pu être détectées. Le pourcentage de mutation évalué pour ce gène nous confirme la bonne qualité de la collection de mutants en terme d'efficacité de la mutagenèse, et nous laisse supposer que nous pouvons espérer une proportion semblable de mutants pour le gène *Pi33*.

La 1^{ère} inoculation par la souche BG1 (Avr *Pi33*) nous a révélé trois types de phénotypes (Figure 14). La plupart des lignées (4 509) ont un phénotype résistant comme le parent C101Lac.

Un deuxième phénotype correspond à treize lignées (0.3%) présentant des nécroses oranges après inoculation avec *M. oryzae*. Ce sont des mutants de type « lesion mimic » car ils forment des lésions ressemblant à une attaque par un agent pathogène. Ces plantes sont mutées dans un ou plusieurs gènes qui entraînent une dérégulation des mécanismes de défense. En moyenne pour les lignées exprimant ce phénotype, 1.24 plantes par lignée était

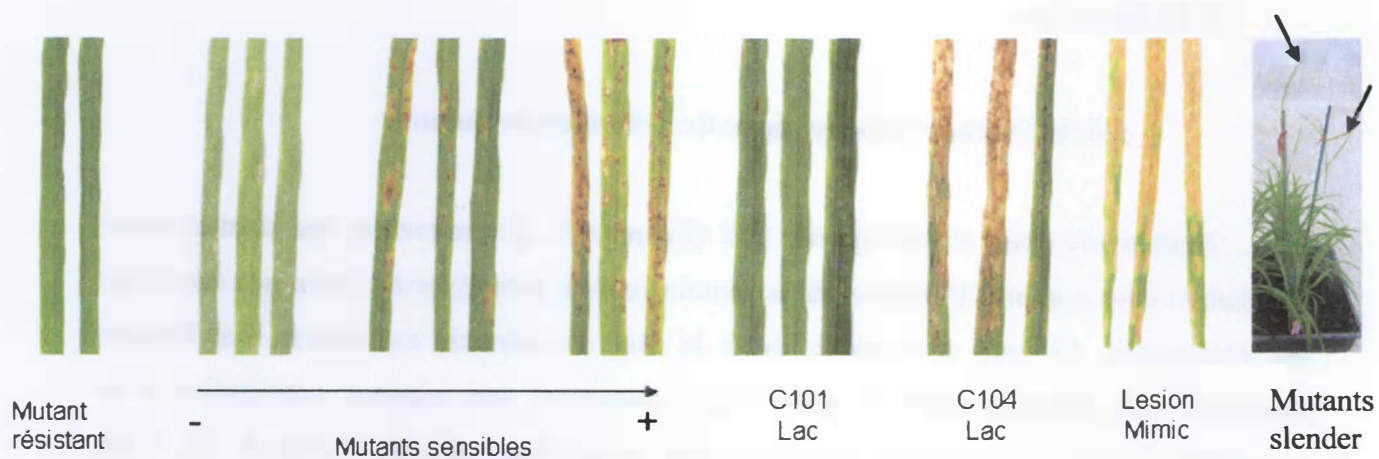


Figure 14 : Phénotypes obtenus lors du criblage de la banque de mutants

muté, ce qui est en accord avec la proportion théorique de 1.25 plantes pour 20 plantes (Cf 2-1-1).

Enfin, le troisième phénotype correspond aux lignées sensibles à la souche BG1 : 99 lignées (2%) ont pu être identifiées. A ce stade, toutes les plantes présentant au moins une lésion de type sensible ont été conservées. Lors de la 2^{ème} inoculation de confirmation par BG1, 70 lignées ont pu être confirmées comme sensibles à *M. oryzae*. Les 29 lignées non confirmées correspondent, généralement, aux lignées ne présentant que quelques lésions lors de la 1^{ère} inoculation.

La troisième inoculation par une souche différente (CD69) nous permet de vérifier la spécificité des mutations observées. Pour cela, nous avons utilisé une souche avirulente vis-à-vis d'un autre gène de résistance : *Pi1*. Si la mutation est spécifique de *Pi33*, les plantes seront résistantes. Par contre, si la mutation n'est pas spécifique de *Pi33*, les plantes seront sensibles. Ce cas de figure est attendu pour des mutations dans des gènes qui seraient en aval de *Pi33* dans le déclenchement des mécanismes de défense. Les 70 lignées ont été confirmées comme résistantes à CD69 donc spécifiques de *Pi33*.

Après récolte, les graines M3 des 70 lignées sensibles ont été semées puis inoculées avec la souche BG1 (Avr *Pi33*) afin de confirmer les phénotypes des mutants M2. Vingt deux lignées ont pu être confirmées en M3 (soit 0.4 % du total des lignées testées). Les inoculations avec BG1 nous ont permis de classer ces 22 mutants pour le phénotype de résistance à *ACE1* selon leur degré de sensibilité. Trois groupes ont pu être déterminés (Figure 14 pour les phénotypes) :

- **5 Lignées très sensibles** : ce sont les mutants présentant un phénotype très proche du témoin sensible C104 Lac.
- **4 Lignées sensibles** : ces mutants présentent un phénotype comportant quelques lésions.
- **11 Lignées moins sensibles** : ce sont les mutants ne présentant qu'une ou deux lésions.

Nous avons choisi dans un premier temps de caractériser les 9 mutants des deux premiers groupes.

2-2-2) Caractérisation des mutants

Au total, une séquence de 2,5 Kb sur 3,5 Kb du gène NB11 3.5 a été obtenue et comparée avec celle de C101Lac pour les 9 mutants. Le traitement à l'EMS provoque des

	385	395	405	415	425	435	445	455	465
C101	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTAGA	GCATCTCTTG	TTAAGCTGTC	TTGGGATGTT	GGCTCACAGT	CACGGCTGGG
3576	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTAGA	GCATCTCTTG	TTAAGCTGTC	TTGGGATGTT	GGCTCACAGT	CACGGCTGGG
5427	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTAGA	GCATCTCTTG	TTAAGCTGTC	TTGGGATGTT	GGCTCACAGT	CACGGCTGGG
3574	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTCGA	GCATCTCTTG	TTGAGCTGTT	TTGGGATGTT	GGCTCACATT	CACGGCTGTG
4629	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTCGA	GCATCTCTTG	TTGAGCTGTT	TTGGGATGTT	GGCTCACATT	CACGGCTGTG
5254	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTCGA	GGATCTCTTG	TTGAGCTGTT	TTGGGATGTT	GCCTCACATT	CACGGCTGTG
5212	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTCGA	GGATCTCTTG	TTGAGCTGTT	TTGGGATGTT	GCCTCACATT	CACGGCTGTG
5287	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTCGA	GGATCTCTTG	TTGAGCTGTT	TTGGGATGTT	GCCTCACATT	CACGGCTGTG
5424	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTCGA	GGATCTCTTG	TTGAGCTGTT	TTGGGATGTT	GCCTCACATT	CACGGCTGTG
5426	TCATGTTTCGG	AGGTGGTGAG	GGGTCATTCC	CAGCTCTCGA	GCATCTCTTG	TTGAGCTGTT	TTGGGATGTT	GGCTCACATT	CACGGCTGTG

Figure 15 : Polymorphisme de séquence dans la zone de Pi33_2
C101 = C101Lac, autres numéros = mutants

	745	755	765	775	785	795	805	815
C101	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
3574	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
3576	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
4629	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
5212	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
5254	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
5287	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
5424	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
5426	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT
5427	CAGATCAAGC	ATCATATCAT	GCACCCTGCA	ACCCGTCACC	TCCCAATAAC	GGTTTGTGCTC	AGGTTGTATC	AAACCCCTAT

Figure 16 : Polymorphisme de séquence dans la zone de l'amorce Pi33_3

mutations ponctuelles aléatoires de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Mais les résultats des séquences des 9 mutants nous montrent 20 sites polymorphes sur 400 pb (Figure 15) dans la zone du couple d'amorce Pi33_2. Ces sites polymorphes permettent de définir deux génotypes de mutants : les mutants ayant la même séquence que C101Lac (2 mutants) et les mutants présentant un polymorphisme (7 mutants). Le polymorphisme observé n'est donc pas lié à des mutations qui devraient être indépendantes d'un mutant à l'autre. Ce résultat suggère que, malgré les précautions prises pour limiter les amplifications non spécifiques, le couple d'amorce Pi33_2 amplifie deux gènes différents. Ce résultat est confirmé par certaines séquences obtenues avec le couple d'amorce Pi33_1 qui montre une double séquence nucléotidique.

Le mutant 5426 présente un polymorphisme de type SNP dans la région de l'amorce Pi33_3, un C muté en T, confirmé par l'amorce forward et reverse (Figure 16). Seul ce mutant présente un polymorphisme dans cette région du gène NB11 3.5. Pour définir si ce changement de base a un impact sur la séquence de la protéine, nous avons traduit la séquence nucléotidique de cette région en acides aminés pour la comparer à la séquence sauvage de C101Lac. Les résultats obtenus nous indiquent que le changement de base n'entraîne pas de changement d'acide aminé. La mutation n'aura donc pas d'impact sur le phénotype.

2-3) Discussion

Le premier résultat important de cette analyse est la bonne qualité de la banque. En effet, sur 4608 lignées M2, 22 sont potentiellement des mutants de *Pi33*. La fréquence de mutation de *Pi33* est cohérente avec la fréquence observée pour les mutants « lesion mimic », 0,4% et 0,3% respectivement. Les connaissances actuelles des mutants « lesion mimic » ne nous permettent pas de savoir si ce phénotype résulte de la mutation d'un ou plusieurs gènes. Par contre, le nombre de lignées mutantes de *Pi33* trouvé lors du criblage phénotypique de la banque reste élevé malgré toutes les étapes de confirmation. En effet, en comparant les mutants « slender » et les mutants de *Pi33*, nous constatons qu'il y a 7 fois plus de lignées mutantes de *Pi33*. Donc, plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être formulées pour expliquer le nombre élevé de mutants de *Pi33* :

(1) Il y aurait encore des faux positifs dans les 22 lignées mutantes restantes. Cette hypothèse est peu probable du fait des différents criblages effectués.

(2) La fréquence observée de mutants « slender » serait inférieure à la fréquence réelle de mutation d'autres gènes. Dans ce cas, il faut supposer que la fréquence de mutations donnant un phénotype est inférieure pour le gène *SLR1*. Cette hypothèse est envisageable si ce gène est essentiel et que la plupart des mutations sont léthales.

(3) en plus de *Pi33*, d'autres gènes, impliqués dans la résistance déclenchée par *Pi33*, seraient mutés. D'après les tests de spécificité des mutations (inoculation avec CD69), les gènes mutés sont spécifiques. Il s'agirait donc de gènes de signalisation ou de défense requis par *Pi33* mais pas par *Pi1*.

Malgré l'utilisation de deux PCR pour amplifier le gène candidat choisi, nous n'arrivons pas à nous soustraire des autres copies du gène NB11. En effet, les résultats obtenus avec les couples d'amorces *Pi33_1* et *Pi33_2*, nous indiquent que deux copies ont été amplifiées. La définition d'amorces plus spécifiques n'étant pas possible, le clonage des produits de PCR sera nécessaire pour caractériser ces zones dupliquées.

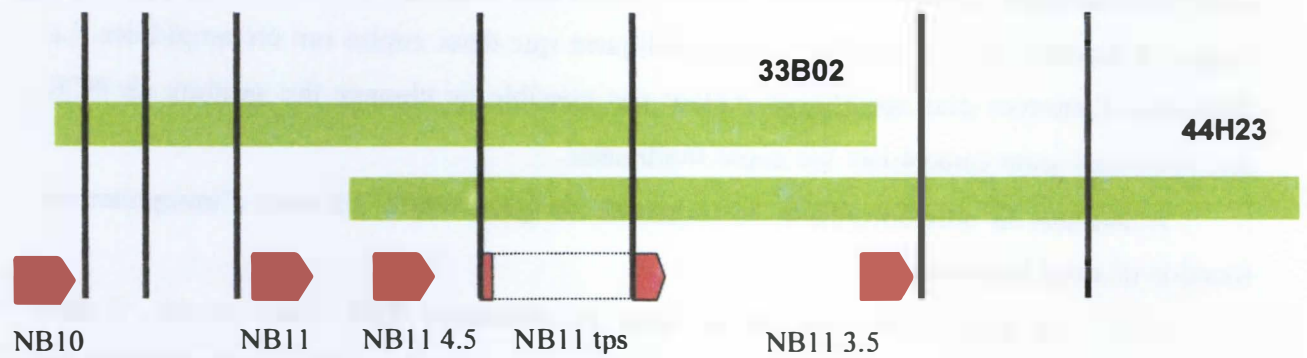
L'absence de polymorphisme de séquence du gène NB11 3.5 peut s'interpréter en fonction de deux hypothèses :

(1) Le gène ciblé n'est pas le gène de résistance *Pi33*. Dans ce cas, il faut continuer le séquençage des autres gènes candidats (par exemple les autres copies de NB11 ou le gène NB10).

(2) Le gène ciblé correspond à *Pi33* mais nous n'avons pas détecté de mutation car elles se situent dans la partie non séquencée. Cette hypothèse semble moins probable car, en théorie, les mutations des différents mutants obtenus ne devraient pas se concentrer sur une zone particulière du gène. Toutefois, cette hypothèse ne peut être exclue. En effet, dans le cas du gène *SLR1* du riz par exemple, la majorité des mutations se concentrent dans une région de 200 pb (Ikeda *et al.*, 2001). Il convient donc de séquencer le reste du gène

La stratégie de clonage basée sur des gènes candidats a permis d'identifier le gène de résistance *Pi9* dans l'interaction riz / *M. oryzae*, alors que toutes les autres stratégies ne fonctionnaient pas (Qu *et al.*, 2006). Cependant ces stratégies restent risquées. En effet, si le gène candidat ciblé n'est pas le bon, tout le travail est à refaire avec un nouveau gène candidat, et, ainsi de suite jusqu'à trouver le bon gène. Dans ce cas, cette stratégie devient longue et peut s'avérer coûteuse. Quand ce type de stratégie est mis en place, il est donc nécessaire de développer en parallèle une stratégie sans *a priori* du type clonage par marche chromosomique.

SmaI / XmaI



3 kb

Figure 17 : Plan de sous clonage des clones BAC 33B02 et 44H23.

3) Sous clonage des clones BAC 33B02 et 44H23

3-1) Matériels et Méthodes

3-1-1) Digestion des clones BAC et du vecteur

Les clones ont été mis en culture à partir d'un stock glycérol dans du milieu LB liquide (Annexe 2) à 37°C avec un antibiotique, le chloramphénicol. L'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit d'extraction Nucleobond® AX de Macherey-Nagel (Annexe 3). Il permet d'extraire et de purifier des plasmides de grandes tailles mais à de faibles concentrations (pas plus de 10 ng / µL). Les ADN extraits ont été digérés par l'enzyme de restriction SmaI. Au cours des expérimentations, SmaI a été remplacée par XmaI qui reconnaît le même site de restriction mais qui est plus efficace. Le choix de ces enzymes a été déterminé à partir des séquences partielles des clones BAC. SmaI permet de digérer les clones BAC sans couper dans les gènes candidats (Figure 17). Nous nous attendons à 6 fragments de 2,5 à 16 Kb pour le clone 33B02 et à 5 fragments de 2,5 à 20 Kb pour le clone 44H23.

Suivant l'enzyme utilisée, la digestion s'effectue soit à 24°C (SmaI) ou à 37°C (XmaI) pendant 2 heures (Annexe 5). L'inactivation de l'enzyme s'effectue à 60°C pendant 10 minutes. La digestion est contrôlée sur gel. Pour éliminer le tampon de digestion et l'enzyme, nous effectuons une purification phénol / chloroforme (Annexe 5).

Pour le vecteur de destination, pCAMBIA 5300 (Annexe 6), nous utilisons le même protocole de culture que les clones BAC mais l'antibiotique utilisé est la kanamycine. L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit Wizard® Plus SV Miniprep de Promega (Annexe 3). A la fin de la digestion, nous rajoutons une phosphatase, APex™ Heat-labile Alkaline Phosphatase d'Epicentre, pour déphosphoryler le vecteur et éviter ainsi la ligation sur lui-même.

3-1-2) Ligation des produits de digestion

La ligation permet d'introduire les fragments d'ADN des clones BAC (appelé inserts) dans le vecteur de destination, pCAMBIA 5300. Les liaisons phosphodiester entre l'insert et le vecteur sont créées à l'aide d'une enzyme particulière, la ligase. Les inserts et le vecteur sont mélangés ensemble dans des proportions vecteur : insert de 3 : 1. (Annexe 5).

3-1-3) Transformation du plasmide recombinant dans *E. coli*

Le produit de ligation est ensuite mélangé avec 50 μ L de cellules compétentes, MAX Efficiency[®] DH10B[™] Competent Cells d'Invitrogen (Annexe 5). Afin d'insérer le produit de ligation dans ces cellules, nous effectuons un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans du milieu LB pendant une heure puis étalées sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solide plus de la kanamycine (Annexe 2). Du X-gal (20 mg/mL) et de l'IPTG (200 mg/mL) sont ajoutés lors de l'étalement.

Le plasmide pCAMBIA 5300 possède le gène Lac Z de l'opéron lactose d'*E. coli* qui peut être utilisé comme marqueur de sélection. L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide aboutit à l'inactivation du gène qui code pour la β -galactosidase. L'activité β -galactosidase est détectée en ajoutant du X-gal, un galactoside dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β -galactosidase. Pour pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur, cet inducteur est l'IPTG (Isopropylthio- β -D-galactoside).

En présence d'IPTG et de X-gal, les bactéries résistantes à la kanamycine et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres. Par contre, les bactéries résistantes à la kanamycine et non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies bleues. Une double sélection est donc possible : sélection par l'antibiotique et sélection visuelle par le X-gal. Seules les colonies blanches seront repiquées dans du milieu LB liquide pour multiplier ces souches et extraire l'ADN plasmidique avec les tampons P1, P2, P3 de Qiagen[®] (Annexe 3).

3-1-4) Vérification des colonies transformées

Trois méthodes ont été utilisées pour confirmer la présence d'un insert dans le plasmide recombinant.

- (1) Libération de l'insert par l'enzyme utilisée lors de la digestion (voir 3-1-1). Deux bandes sont attendues : l'insert et le vecteur. Mais le site de coupure de l'enzyme a pu être dégradé lors de la ligation donc la digestion peut ne pas fonctionner.
- (2) Libération de l'insert par une autre enzyme présente dans le site multiple de clonage de pCAMBIA 5300. Nous avons utilisé l'enzyme EcoRI. L'insert pouvant être coupé à différents endroits, les profils de digestion sont plus complexes et, donc, potentiellement plus difficile à interpréter.

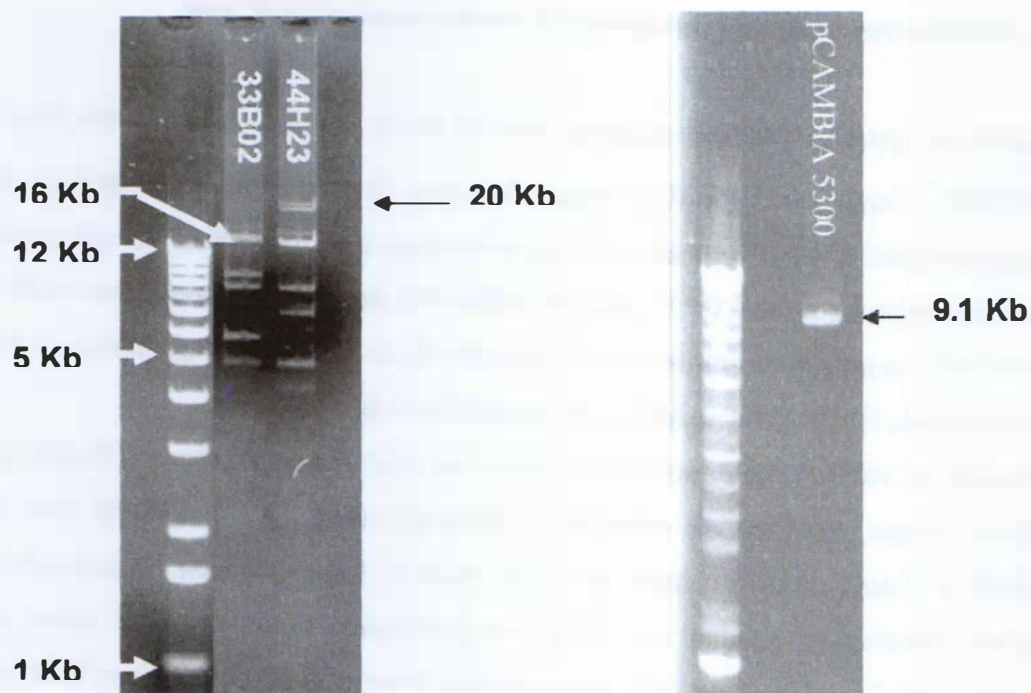


Figure 18 : Profils de digestion des clones BAC 33B02 et 44H23, et du vecteur pCambia 5300 par SmaI

	Clone BAC 33B02			Clone BAC 44H23		
Colonies blanches obtenues après transformation	168			69		
Colonies vérifiés	53			37		
Taille des fragments clonés	<5 Kb	>5 Kb (vecteur)	>5 Kb (riz)	<5 Kb	>5 Kb (vecteur)	>5 Kb (riz)
Nombre de clones	36	15 (de 7 à 20 Kb)	2 (6 Kb; Transposons CACTA)	30	7 (7 à 9 Kb)	0

Tableau 1 : Résultats du sous clonage des clones BAC 33B02 et 44H23

- (3) Une PCR avec des couples d'amorces (Annexe 4) amplifiant différentes zones des clones BAC étudiés a été effectué pour vérifier quelle zone des clones BAC a été clonée.

Une fois toutes ces étapes réalisées, les extrémités de l'insert sont séquencées par la société GATC Biotech après amplification par des amorces placées de part et d'autre du site d'insertion (amorces universelles M13, Annexe 4). Ces séquences peuvent être comparées aux séquences des clones BAC 33B02 et 44H23 dont nous disposons.

3-2) Résultats et Discussion

Les profils de digestion des clones BAC 33B02 et 44H23 et de pCAMBIA 5300 (9,1Kb) sont ceux attendus. En effet, nous observons que 6 fragments de 2,5 Kb à 16 Kb sont relâchés pour 33B02, et 5 fragments de 2,5 Kb à 20 Kb pour 44H23 (Figure 18). Après plusieurs séries de transformations, 168 colonies blanches pour 33B02 et 69 colonies blanches pour 44H23 ont été obtenues (Tableau 1). Soixante pourcent du total des colonies obtenues après transformation a été testé pour déterminer quelle région des clones BAC a été insérée. Pour 33B02 et 44H23, 53 et 37 colonies respectivement ont été vérifiées par nos trois méthodes. Tous les clones ayant des inserts de grande taille (>5 Kb) ont été retenus pour le séquençage. En effet, grâce aux séquences partielles des clones BAC, la position des gènes candidats a pu être déterminée. Les petits fragments d'ADN se situent dans des régions ne comportant pas de gène candidat. Les deux fragments les plus intéressants sont le fragment de 16 Kb du clone BAC 33B02 qui comporte les gènes NB11 et NB11 4.5, et le fragment de 20 Kb du clone BAC 44H23 qui comporte le gène NB11 3.5 (Figure 17). Nous avons retenu 17 clones pour 33B02 et 7 clones pour 44H23 pour le séquençage. Ce résultat nous montre que la probabilité d'insérer de petits fragments d'ADN est beaucoup plus forte que d'insérer de gros fragment d'ADN.

Les résultats de séquençage nous indiquent que seul deux clones sur 17 ont inséré des fragments du clone BAC 33B02 (Tableau 1). Les deux fragments clonés correspondent au transposon CACTA de la partie gauche du clone BAC 33B02. Les autres, malgré la présence d'insert de 20 Kb et 16 Kb dans leur profil de digestion correspondent au vecteur pCAMBIA 5300.

Les résultats décrits ci-dessus ont été obtenus avec un protocole amélioré au cours des expérimentations. En effet, initialement, les tampons P1, P2, P3 de Qiagen® étaient utilisés pour l'extraction des clones BAC, le vecteur était déphosphorylé avec l'Antartic Phosphatase de Biolabs et la première enzyme de restriction utilisée était SmaI.

Dans la première expérience de clonage, après transformation des cellules compétentes, aucune colonie de couleur blanche n'a été obtenue mais beaucoup de colonies bleues étaient présentes. Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs causes dont une qui nous semble la plus pertinente. L'interaction entre des composés de la solution de digestion et la ligase limiterait l'efficacité de l'enzyme (communication personnelle de JC Breitler).

Nous avons décidé d'ajouter une purification des produits de digestion par le phénol et le chloroforme avant de procéder à la ligation. Quelques colonies blanches ont été obtenues mais lors de l'étape de vérification, aucune colonie n'avait inséré de fragment. Les profils de digestion ne correspondaient qu'au vecteur pCAMBIA 5300 (Figure 19). Donc, nous nous sommes interrogés sur la qualité de l'extraction des clones BAC. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un autre kit d'extraction de plasmide mais sur colonne, Nucleobond® AX de Macherey-Nagel, qui permet d'obtenir un ADN plus pur mais en plus petite quantité.

Avec ces deux étapes de purification, de nombreuses colonies ont été obtenues. La majorité a inséré des fragments inférieurs à 5 Kb mais certaines présentaient des fragments de 16 et 20 Kb. Après séquençage, ces fragments se sont révélés être du vecteur pCAMBIA 5300. Ce résultat nous indique que les cellules compétentes que nous utilisons ont un fort taux de recombinaison homologue. Donc, nous avons utilisé d'autres cellules compétentes utilisées habituellement en clonage, DH5α d'Invitrogen pour les comparer. Aucune différence n'a été obtenue avec ces nouvelles cellules compétentes. Elles présentaient aussi un taux de recombinaison homologue élevé.

Pour essayer de comprendre ces résultats, nous nous sommes intéressés à la qualité de la digestion des clones BAC et du vecteur. L'enzyme de restriction XmaI a été utilisée à la place de SmaI. Cette enzyme a le même site de restriction que SmaI mais génère des bouts cohésifs à la place de bouts francs. De plus, XmaI aurait une efficacité plus importante que SmaI (communication personnelle de M. Royer). Avec ce changement d'enzyme, la phosphatase de Biolabs a été remplacée par l'APex™ Heat-labile Alkaline Phosphatase d'Episcience pour essayer de limiter le nombre de colonies bleues (vecteur reliqué sur lui-même) qui reste encore important (communication personnelle de M. Royer).

De nombreuses colonies blanches et peu de colonies bleues ont été ainsi obtenues. La majorité des clones présentaient des fragments inférieur à 5 Kb et d'autres des fragments de 6-

7 Kb. Aucune des colonies blanches récupérées n'a inséré un fragment de plus de 7 Kb. C'est à cette étape que deux clones ayant inséré des fragments du clone BAC 33B02 (transposon CACTA) ont été récupérés.

En théorie, le plasmide pCAMBIA 5300 permet le clonage de fragments de 15-20 Kb. Dans la pratique, les résultats nous montrent que la taille maximum du fragment d'ADN qui peut être cloné dans pCAMBIA 5300 est d'environ 7 Kb. Dans la littérature, les plasmides sont souvent utilisés pour cloner des fragments inférieurs à 10 Kb. Donc, pour notre expérimentation, il semble que le vecteur soit un facteur limitant et, à l'avenir, il nous faut un vecteur de destination qui puisse accepter des fragments de 20 Kb. Lors du clonage du gène de résistance *Pi9* dans l'interaction riz / *M. oryzae* (Qu *et al.*, 2006), les auteurs ont utilisé un vecteur de type TAC (Transformed-competent Artificial Chromosome), pRTAC 8 (Qu *et al.*, 2003). Ils ont pu cloner des fragments de 45 Kb et les transférer dans le riz ensuite. Ce vecteur est en cours de test dans notre laboratoire.

4) Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons eu comme objectif d'identifier et de cloner un gène de résistance du riz, *Pi33* correspondant au gène d'avirulence *ACE1* de *M. oryzae*. Deux stratégies ont été employées pour essayer de répondre à ces objectifs : une stratégie avec *a priori* (gène candidat) et une stratégie sans *a priori* (sous clonage de clones BAC).

Pour identifier le gène de résistance *Pi33*, nous avons créé une banque de mutants traitée à l'EMS d'une variété de riz résistant à la pyriculariose. Le criblage de cette banque nous a permis d'identifier 22 mutants susceptibles d'être des mutants de *Pi33*. Neuf de ces mutants ont été séquencés dans les deux tiers du gène candidat NB11 3.5 mais aucun ne présentait de mutation. Pour rechercher des mutations de ce gène, de nouvelles amorces seront utilisées pour permettre d'amplifier le dernier tiers du gène candidat. Si aucun changement de base entraînant une mutation n'est mis en évidence, les mutations dans un autre gène candidat seront recherchées. Par contre, si des mutations sont observées dans NB11 3.5, ce gène sera un candidat très probable pour *Pi33* et devra être testé par des tests de complémentation de plantes sensibles.

La deuxième partie du projet consistait à sous cloner des clones BAC. 33B02 et 44H23. Ces deux clones contiennent des gènes susceptibles d'être *Pi33*, principalement des NBS-LRR. Deux fragments nous intéressent principalement : un de 16 Kb sur le clone BAC 33B02 et un de 20 Kb sur le clone BAC 44H23. Lors des étapes de clonage, de nombreux problèmes sont apparus et, chaque problème a été traité indépendamment afin de trouver une solution. A partir d'un protocole classique de transformation ne donnant aucun clone, nous avons pu apporter des améliorations et obtenir des transformations nous donnant de nombreux clones ayant inséré des fragments inférieurs à 5 Kb. Le résultat le plus probant est la mise en place d'un protocole finalisé qui nous a permis de cloner des fragments de 7 Kb correspondant au transposon CACTA du clone BAC 33B02. Le vecteur de destination (plasmide) s'est révélé peu performant pour le clonage de fragments de grandes tailles. Il explique en grande partie l'absence d'obtention de clone ayant intégré les fragments attendus. Pour résoudre ce problème, un vecteur TAC, pRTAC8, sera utilisé. Il permettra d'insérer de larges inserts comme nos deux fragments de 16 Kb et 20 Kb. La suite de cette étape sera de compléter une variété sensible à la pyriculariose via *Agrobacterium tumefaciens*. La complémentation permettra de déterminer quel gène est responsable de la résistance.

Malgré les difficultés rencontrées pour cloner ce gène, le clonage de *Pi33* reste un objectif de l'équipe. En effet, seul le clonage de *Pi33* permettra de répondre à la question : Comment *Pi33* et *ACE1* interagissent-ils entre eux? A ce jour, peu d'interactions gène de résistance / gène d'avirulence fongique ont été étudiées au niveau moléculaire. Ces interactions sont donc mal connues. De plus, il a été montré que le gène d'avirulence *ACE1* ne présente pas les caractéristiques d'un gène d'avirulence fongique habituel. Il code une protéine de grande taille, non sécrétée par le champignon, et entraînerait la synthèse d'un métabolite secondaire reconnu par le gène de résistance *Pi33*. Cette originalité confère un intérêt supplémentaire à l'étude moléculaire du couple *Pi33* / *ACE1*.

Bibliographie

Ballini E, Berruyer R, Morel JB, Lebrun MH, Nottéghem JL, Tharreau D (2007) Modern elite rice varieties of the 'Green Revolution' have retained a large introgression from wild rice around the Pi33 rice blast resistance locus. *New Phytol.* 175:340-350

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Tharreau D (2002) Characterization of Pi33, a resistance gene in rice interacting with *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. *International Rice Research Newsletter* 27:11-12

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D (2003) Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. *Theor Appl Genet.* 107:1139-1147

Böhnert HU, Fudal I, Dioh W, Tharreau D, Nottéghem JL, Lebrun MH. (2004) A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *Plant Cell.* 16:2499-2513

Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B. (2000) tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell.* 12:2033-2046

Chen X, Shang J, Chen D, Lei C, Zou Y, Zhai W, Liu G, Xu J, Ling Z, Cao G, Ma B, Wang Y, Zhao X, Li S, Zhu L (2006) A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J.* 46 (5):794-804

Collemare J. (2007) Communication entre les plantes et leurs agents pathogènes : rôle des métabolites secondaires dans la reconnaissance du champignon *Magnaporthe grisea* par le riz. Thèse de doctorat Paris XI. pp 219

Dangl JL, Jones J (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411:826-833

Dardick C, Ronald P (2006) Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog.* 2006 Jan;2(1):e2

Dean RA, Talbot N, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeier C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW. (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980-986

Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:2404-2409

De Witt PJ, Joosten MH (1999) Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum*-tomato interaction. *Curr.Opin.Microbiol.* 2:368-373

Diener AC, Ausubel FM (2005) RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* 1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics*. 171 (1):305-21

Ebbole D (2007) Magnaporthe as a Model for Understanding Host-Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45

Feuillet C, Shachermayer G, Keller B. (1997) Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. *Plant J.* 11:45-52

Flor H (1971) Current Status of the Gene-for-Gene concept. *Annual review Phytopathology* 9:275-296

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296:92-100

Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J. (2001) slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* 13:999-1010

Jia Y, McAdams S, Bryan GT, Hershey HP, Valent B. (2000) Direct Interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 19:4004-4014

Liu X, Lin F, Wang L, Pan Q. (2007) The in silico map-based cloning of pi36, a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. *Genetics* 76:2541-2549

Mackey D, Holt BF 3rd, Wiig A, Dangl JL (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell*. 108(6):743-54

Martin GB, Brommonscheikel S, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436

Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol.* 54:23-61

Monosi B, Wissner RJ, Pennill L, Hulbert SH (2004) Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theor Appl Genet.* 109(7):1434-47

Qu S, Liu G, Zhou B, Bellizzi M, Zeng L, Dai L, Han B, Wang GL. (2006) The broad-spectrum blast resistance gene Pi9 encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics* 172:1901-1914

Salmeron JM, Oldroyd G, Rommens CM, Scofield SR, Kim HS, Lavelle DT, Dahlbeck D, Staskawicz BJ. (1998) Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell* 86:123-133

Song W, Wang G, Chen L, Kim H, Pi L, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W, Zhu L, Fauquet C, Ronald P. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*. 270:1804-1806

Staskawicz B, Ausubel F, Baker B, Ellis J, Jones J. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268:661-667

Thompson JD, Higgins DN, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680

Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T. (1999) The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J* 19:55-64

Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 296:79-92

Zhou B, Qu S, Liu G, Dolan M, Sakai H, Lu G, Bellizzi M, Wang GL. (2006) The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between Pi2 and Piz-t resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:1216-1228

Annexe 1 : Culture du riz en serre, préparation de l'inoculum, inoculation

Culture du riz en serre

Substrat :

Terreau (Neuhaus n°9)	7/8 ^{ème}
Pouzzolane	1/8 ^{ème}

Les semis sont réalisés sur des terrines de semis de 30 x 50 x 7 cm.

Un arrosage léger est réalisé en début de croissance (éviter l'anoxie des racines).

Solution nutritive :

Engrais NPK 17/7/22	1,5 g/L
Hortrillon (Oligo-éléments)	0,25 g/L
Chelate EDTA 6% Fe	0,25 g/L

Premier apport 10 à 15 jours après semis, puis tous les 7 à 10 jours.

Préparation de l'inoculum

Les souches de *M. oryzae* sont cultivées 10 jours sur milieu farine de riz (Annexe 2), à 28°C, avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12h/12h. Afin de limiter l'évaporation, les boîtes sont scellées avec du ruban adhésif (Tesa[®] 5280).

Les spores sont prélevées en versant sur la boîte 5 ml d'eau stérile, puis en prélevant la suspension ainsi obtenue. Cette suspension est calibrée par comptage sur cellule de Malassez.

Inoculation, lecture des symptômes

L'inoculation se fait au stade 3-4 feuilles, soit 20 à 30 jours après semis. Elle se fait par pulvérisation, à l'aide d'un pistolet à air comprimé, d'une suspension à 50 000 spores/mL dans une solution à 0.5% de gélatine.

La lecture des symptômes se fait 7 à 10 jours après l'inoculation.

Annexe 2 : Milieux de culture pour les micro-organismes

Milieu « farine de riz »

Agar	15g
Farine	20g
Extrait de Levure	1.5g
Eau	1 L

Autoclave 20 minutes à 120°C.

500 000 U.I. de péniciline (ajoutée après autoclavage).

Milieu LB

Bactotryptone	10 g/L	
Extrait de levure	5 g/L	
NaCl	10 g/L	
Agar	20 g/L	(Seulement pour LB solide)
Eau	1 L	

Autoclave 20 minutes à 120°C.

Ajouts éventuels :

Kanamycine (25 µg/mL)	1 mL/L
Chloramphénicol (12,5 µg/mL)	1 mL/L

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN

a) ADN des feuilles de riz (Berruyer *et al.*, 2003)

Après broyage des feuilles qui ont été préalablement séchées pendant 3-4 jours par des billes de Silice dans des tubes de 2 mL, nous rajoutons 600 µL de MATAB à 65°C. Les tubes sont ensuite incubés 30 minutes à 65°C. Sous sorbonne, 600 µL de chloroforme sont ajoutés puis le mélange est agité pendant 15 secondes. Une centrifugation de 30 minutes à 13 000 rpm est effectuée pour séparer les deux phases. Le surnageant est récupéré et 0,8 volume d'isopropanol est ajouté (formation de la pelote d'ADN). Le mélange est centrifugé 30 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé en renversant les tubes. 300µL d'éthanol à 70% sont ajoutés dans chaque tube puis centrifugé pendant 25 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé. Les tubes sont mis à sécher sous la sorbonne pour évaporer tout l'éthanol. Le culot est ensuite resuspendu dans 100 µL H₂O ultra pure.

b) ADN plasmidique des clones BAC (Nucleobond AX de Machery-Nagel)

Les ADN sont extraits suivant le protocole fourni avec le kit d'extraction Nucleobond® AX de Macherey-Nagel. Préparer 30 ml de culture BAC dans du milieu LB chloramphénicol (125 µg/ml). Laisser toute la nuit à 37°C. Centrifuger la culture à 3000 rpm, 20°C, 20 minutes. Jeter le surnageant, resuspendre le culot dans 400 µL de tampon S1.

Ajouter 400 µL de S2 et mélanger par inversion. Incuber 2-3 minutes à température ambiante. Ce mélange lyse les bactéries. Ajouter 400 µL de tampon S3 et incuber sur glace pendant 5 minutes. Centrifuger à 4°C, 15 minutes à 13 000 rpm. Récupérer le surnageant et le transférer sur une colonne (écoulement par gravité). Nettoyer la colonne deux fois avec 1,5 mL de tampon N3 en jetant la solution du tube collecteur. Eluer l'ADN plasmidique avec 1 mL de tampon N5. Ajouter 750 µL d'isopropanol et centrifuger à 4°C, 30 minutes à 13 000 rpm. Ajouter 500 µL d'éthanol à 70% et centrifuger à 4°C, 10 minutes à 13 000 rpm. Eliminer le surnageant et laisser les tubes sécher sous la sorbonne. Resuspendre le culot dans 30 µL d'H₂O ultra pure.

Composition des tampons :

S1 : 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml, pH 8.0

S2 : 200 mM NaOH, 1% SDS

S3 : 2.80 M KAc, pH 5.1

N1 : 100 mM Tris/H₃PO₄, 15% ethanol, 400 mM KCl, pH 6.3
N3 : 100 mM Tris/H₃PO₄, 15% ethanol, 1150 mM KCl, pH 6.3
N5 : 100 mM Tris/H₃PO₄, 15% ethanol, 1000 mM KCl, pH 8.5

c) ADN plasmidique du vecteur pCAMBIA 5300 (Wizard de Promega)

Les ADN sont extraits suivant le protocole fourni avec le kit d'extraction Wizard® Plus SV Miniprep de Promega. A partir d'un stock à -80°C, préparer une culture de clone BAC de 2 mL de milieu LB et kanamycine. Incuber toute la nuit à 37°C. Transvaser dans des tubes de 1,5 mL et centrifuger à 21°C, 10 minutes à 13 000 rpm. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 250 µL de Tampon de resuspension. Ajouter 250 µL de tampon de lyse et incubé sur paillasse pendant 5 minutes. Ajouter 10 µL de Protéase Alkaline et mélanger avec la pipette. Incuber pendant 5 minutes sur paillasse. Ajouter 350 µL de tampon de neutralisation et centrifuger à 21°C, 10 minutes à 13 000 rpm.

Transférer le surnageant sur une colonne avec son tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 13 000 rpm. Pré-laver la colonne avec 750 µL de solution de lavage et centrifuger 1 minute à 13 000 rpm. Laver la colonne avec 250 µL Solution de lavage et centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm.

Transférer la colonne sur un tube propre de 1,5 mL. Déposer 50 µL d'H₂O pure et laisser agir 15 minutes. Centrifuger 1 minute à 13 000 rpm. Jeter la colonne.

d) Tampon P1, P2, P3 de Qiagen®

A partir d'un stock à -80°C, préparer une culture de clone BAC de 2 mL de milieu LB et de l'antibiotique approprié. Incuber toute la nuit à 37°C. Transvaser dans des tubes de 1,5 mL et centrifuger à 20°C, 10 minutes à 13 000 rpm. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 100 µL de Tampon de resuspension P1. Ajouter 100 µL de tampon de lyse P2 et incubé sur paillasse pendant 5 minutes. Ajouter 150 µL de tampon de neutralisation P3 et incubé sur glace 10 minutes. Ensuite, centrifuger à 8°C, 15 minutes à 13 000 rpm. Transférer 350 µL de surnageant dans des tubes propres. Ajouter 900 µL d'Ethanol absolu froid et centrifuger à 13 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Eliminer le surnageant et ajouter 400 µL d'éthanol à 70%. Centrifuger à 4°C, 10 minutes à 13 000 rpm. Eliminer le surnageant et laisser sécher les tubes sous sorbonne pendant 1 heure. Resuspendre le culot dans 50 µL d'H₂O ultra pure.

Composition des tampons :

Tampon P1 :

Tris/Hcl	50 mM
EDTA	10 mM
pH	Ajusté à 8 avec du HCl

Tampon P2 :

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Tampon P3 :

5M Potassium acétate	60 mL
Acide acétique glacial	28,5 mL
ddH2O	11,5 mL
pH	4,8-5,2

Annexe 4 : Amplification par PCR et Amorces

PCR Long-range:

Mélange :	ADNc	200 ng
	Amorces cDNA NB11 R+F 10mM	1 µl
	Tampon 10 x	2 µl
	MgCl ₂ 25 mM	0.8 µl
	dNTPmix 2 mM	2 µl
	Taq polymerase	0.8 µl
	H ₂ O	qsp 20 µl

Condition de PCR :	5 min 95°C
	15 sec 95°C
Cycle x10	30 sec 50°C
	4 min 30 sec 68°C
	15 sec 95°C
Cycle x20	30 sec 50°C
	4 min 30 sec 68°C + 20s chaque cycle
	10 min 72°C
	infini 10°C

Vérifier le produit de PCR sur gel.

Faire une dilution du produit de PCR au 50^{ème}.

PCR classique

Amorces Pi33_1, Pi33_2, Pi33_3, Pi33_6

Mélange :	ADN	moins de 5 ng
	Amorces R+F 10mM	1 µl
	Tampon 10 x	2 µl
	MgCl ₂ 25 mM	0.8 µl
	dNTPmix 2 mM	2 µl
	Taq polymerase	0.8 µl
	H ₂ O	qsp 20 µl

Conditions de PCR :	5 min 95°C
	30 sec 95°C
	30 sec 62°C
	30 sec 72°C
	5 min 72°C
	infini 10°C

Vérifier l'amplification sur gel et refaire une PCR dans un grand volume (40 µL) pour le séquençage.

Amorces utilisées :

Les amorces utilisées ont été créées à partir du programme PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) et ont été synthétisées par Eurogentec.

Gène ciblé	Nom des amorces	séquences forward	séquences reverses	Température d'amplification	Taille des fragments attendues	Type de PCR
NB11	IR64_cDNA NB11F	GGCAGATGCTTAATTCGTTG	CAGTACGGTGCCACAGCTT	60°C	3.5 Kb	Long-range
intérieurNB11	Pi33_1	CTGGGGTCTTCTGTTGGAAA	CATACACGGAACATGCTCTG	62°C	700 pb	Classique
	Pi33_2	GCGAGCAGACCAATCTAAGG	TATCGATGCCCACTCACAA	62°C	700 pb	
	Pi33_3	CGGCAATATCCAGAGGACTA	TGCGAGGAAATCTAGACAGTG	62°C	700 pb	
	Pi33_6	CATGTCAAGTCCCCTGATGA	GCGGCAAACCTCCACACTTT	62°C	700 pb	
BAC 33B02 et 44H23	IR64N1	CCCTCTCCAAATTGAGTAGCA	GGATGTCAAAAGGTGGGAGA	62°C	270 pb	
	IR64N2	AGGCGCACTTGCATCAAT	ATGCCCCTATGAACACCTTG	62°C	290 pb	
	IR64N3	TGCTTATCCCATCATTTCAATT	GCATTTTCAGGGATTTTAGCC	62°C	124 pb	
BAC 33B02	IR64N4	CCCGTTTCGATCAAACAAC	TCATTGGAGGAAGGAACGAG	62°C	194 pb	
BAC 44H23	IR64N5	GATCCTCTCCCCTTCCAGTC	GCCACACTCAAAAACAAGCA	62°C	183 pb	
BAC 44H23	IR64N6	GACACGTGAACCCAGAACCT	TAATGCATGTCGAGCTTTCG	62°C	201 pb	
BAC 33B02	IR64N7	AATAATTGCAAGCGGCAAAC	CTGGGCATGTAGGAACCATC	62°C	175 pb	
site de clonage de pCAMBIA 5300	M13	TGTAAAACGACGGCCAGT	CAGGAAACAGCTATGACC	60°C	Variable selon insert	séquençage

Annexe 5 : Protocole utilisé lors du sous clonage des clones BAC

a) Digestion

ADN	2 μ L
SmaI / XmaI	2 μ L
Tampon de digestion	2 μ L
BSA	1 μ L
H ₂ O	q.s.p 20 μ L

Incubation deux heures à 24°C pour SmaI et 37°C pour XmaI.

Pour le vecteur, 1 μ L d'APexTM Heat-labile Alkaline Phosphatase d'Epicentre est rajouté 10 minutes avant la fin de la digestion.

L'enzyme est inactivé à 65°C pendant 15 minutes.

b) Purification Phénol / Chloroforme

Ajouter 1 volume de phénol (pipeter dans le fond de la bouteille). Vortexer. Centrifuger 5 minutes à 13 000 rpm. Récupérer la partie haute du surnageant sans toucher celle en dessous et la mettre dans un nouveau tube. Sous sorbonne, ajouter 1 volume de chloroforme. Vortexer. Centrifuger 5 minutes à 13 000 rpm. Récupérer la partie haute du surnageant sans toucher celle en dessous et la mettre dans un nouveau tube. Répéter cette opération une fois. Ajouter 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M pH 5.2. Ajouter 2 volumes d'Ethanol absolu froid. Vortexer. Centrifuger 20 minutes à 13 000 rpm. Enlever tout le surnageant. (quitte à recentrifuger). Ajouter 500 μ L d'Ethanol à 70%. Vortexer. Centrifuger 20 minutes à 13 000 rpm. Enlever tout le surnageant. Laisser le tube sécher. Resuspendre le culot dans 100 μ L d'eau.

c) Ligation

La ligation est réalisée dans le mélange réactionnel suivant :

ADN (10 ng/ μ L)	3 μ L
Vecteur pCAMBIA 5300 (50 ng/ μ L)	2 μ L
Tampon de ligation 2×	2 μ L

Ligase phage T4 (1U/ μ L)

3 μ L

H₂O

q. s. p. 20 μ L

Le mélange réactionnel est incubé une nuit à 16°C.

d) Transformation

Les tubes contenant 100 μ L de cellules compétentes DH10B sont mises à décongeler dans la glace et 2 μ L de mélange de ligation sont ajoutés par tube. Après une incubation de 30 minutes dans la glace, les cellules sont soumises à un choc thermique : 45 secondes à 42°C, puis deux minutes dans la glace.

Les bactéries sont alors mises 1 h à 37°C sous agitation dans 250 μ L de milieu LB afin de permettre l'expression phénotypique des plasmides au sein des bactéries transformées. Cent μ L de bactéries sont ensuite étalés sur milieu solide LB + Kanamycine (25 μ g/mL). Les colonies transformées génèrent des colonies blanches après 24h d'incubation à 37°C.

Annexe 6 : Carte du vecteur pCAMBIA 5300

pCAMBIA 5300 (9.8 Kb) : résistant à la Kanamycine

